

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
16. August 2001 (16.08.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/59128 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/54,
15/82, 9/10, A01H 5/00, C07K 16/40, C12P 7/64, C11B
1/00, C11C 1/00, G01N 33/573, C12Q 1/48, A61K 38/45

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/01346

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. Februar 2001 (08.02.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 05 973.2 9. Februar 2000 (09.02.2000) DE
100 23 893.9 17. Mai 2000 (17.05.2000) DE
100 63 387.0 19. Dezember 2000 (19.12.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HEINZ, Ernst [DE/DE]; Püttkampsweg 13, 22609 Hamburg (DE). ZANK, Thorsten [DE/DE]; Lorenzengasse 13, 22303 Hamburg (DE). ZÄHRINGER, Ulrich [DE/DE]; Parkallee 22, 23845 Borstel (DE). LERCHL, Jens [DE/DE]; Im Steg 36, 68526 Ladenburg (DE). RENZ, Andreas [DE/DE]; Heinrich-von-Kleist-Str. 6, 67117 Limburgerhof (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; 67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: NOVEL ELONGASE GENE AND METHOD FOR PRODUCING MULTIPLE-UNSATURATED FATTY ACIDS

(54) Bezeichnung: NEUES ELONGASEGEN UND VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG MEHRFACH UNGESÄTTIGTER FETTSÄUREN

(57) Abstract: The invention relates to a novel elongase gene comprising the sequences cited in sequence SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 and SEQ ID NO:7 or to homologues, derivatives or analogues thereof. The invention also relates to a gene construct containing these genes or homologues, derivatives or analogues thereof, and to its use. The invention additionally relates to the vectors or transgenic organisms containing an elongase gene comprising the sequence SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 and SEQ ID NO:7 or containing homologues, derivatives or analogues thereof. The invention relates to the use of the elongase sequences alone or in combination with additional elongases and/or with additional fatty acid biosynthesis genes. The invention relates to a novel elongase gene comprising the sequence SEQ ID NO:1 or to homologues, derivatives or analogues thereof. The invention also relates to a method for producing multiple-unsaturated fatty acids and to a method for introducing DNA into organisms which produce large quantities of oils and, in particular, oils having a high content of unsaturated fatty acids. The invention further relates to an oil and/or to a fatty acid preparation having a high content of multiple-unsaturated fatty acids that contain at least two double bonds and/or to a triacylglycerin preparation having a high content of multiple-unsaturated fatty acids that contain at least two double bonds.

WO 01/59128 A2

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein neus Elongasegen mit den in Sequenz SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 und SEQ ID NO:7 genannten Sequenzen oder ihre Homologen, Derivate oder Analoga, ein Genkonstrukt, das diese Gene oder ihre Homologen, Derivate oder Analoga enthält, sowie seine Verwendung. Die Erfindung betrifft zudem Vektoren oder transgene Organismen, die ein Elongasegen mit der Sequenz SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 und SEQ ID NO:7 oder seine Homologen, Derivate oder Analoga enthalten. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung der Elongasegensequenzen allein oder in Kombination mit weiteren Elongasen und/oder weiteren Fettsäure-Biosynthesegenen. Diese Erfindung betrifft ein neues Elongasegen mit der Sequenz SEQ ID NO:1 oder seine Homologen, Derivate oder Analoga. Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren sowie ein Verfahren zum Einbringen von DNA in Organismen, die grosse Mengen an Ölen und insbesondere Ölen mit hohem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren produzieren. Außerdem betrifft die Erfindung ein Öl und/oder eine Fettsäure-Zubereitung mit höherem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen und/oder eine Triacylglycerin-Zubereitung mit höherem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen.



eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("*Guidance Notes on Codes and Abbreviations*") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Veröffentlicht:

- *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

Neues Elongasegen und Verfahren zur Herstellung mehrfach
ungesättigter Fettsäuren

5 Beschreibung

Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein neue Elongasegene mit den in Sequenz
10 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9
und SEQ ID NO:11 genannten Sequenzen oder ihre Homologen,
Derivate oder Analoga, ein Genkonstrukt, das diese Gene oder ihre
Homologen, Derivate oder Analoga enthält, sowie seine Verwendung.
Die Erfindung betrifft zu dem Vektoren oder transgene Organismen,
15 die ein Elongasegen mit der Sequenz SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3,
SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 oder
seine Homologen, Derivate oder Analoga enthalten. Weiterhin
betrifft die Erfindung die Verwendung der Elongasegensequenzen
allein oder in Kombination mit weiteren Elongasen und/oder
20 weiteren Fettsäure-Biosynthesegenen. Diese Erfindung betrifft
ein neues Elongasegen mit der Sequenz SEQ ID NR:1 oder seine
Homologa, Derivate oder Analoga.

Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung mehr-
25 fach ungesättigter Fettsäuren sowie ein Verfahren zum Einbringen
von DNA in Organismen, die große Mengen an Ölen und insbesondere
Ölen mit hohem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren produzieren.
Außerdem betrifft die Erfindung ein Öl und/oder eine Fettsäure-
Zubereitung mit höherem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fett-
30 säuren mit mindestens zwei Doppelbindungen und/oder eine Triacyl-
glycerin-Zubereitung mit höherem Gehalt an mehrfach ungesättigten
Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen.

Hintergrund der Erfindung

35 Bestimmte Produkte und Nebenprodukte natürlich vorkommender
Stoffwechselprozesse in Zellen sind für ein breites Spektrum an
Industrien, einschließlich der Futtermittel-, Nahrungsmittel-,
Kosmetik- und pharmazeutischen Industrie, nützlich. Zu diesen
40 gemeinsam als "Feinchemikalien" bezeichneten Molekülen gehören
auch Lipide und Fettsäuren, unter denen eine beispielhafte Klasse
die mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind. Mehrfach ungesättigte
Fettsäuren (*polyunsaturated fatty acids*, PUFAs) werden beispiels-
weise zu Nahrungsformulierungen für Kinder gegeben, um einen
45 höheren Nährwert dieser Formulierungen zu erzeugen. PUFAs haben
zum Beispiel einen positiven Einfluß auf den Cholesterinspiegel
im Blut von Menschen und eignen sich daher zum Schutz gegen Herz-

krankheiten. Feinchemikalien und mehrfach ungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) lassen sich aus tierischen Quellen, wie beispielsweise Fisch oder Mikroorganismen, isolieren. Durch Anzucht dieser Mikroorganismen lassen sich große Mengen eines oder mehrerer gewünschter Moleküle produzieren und isolieren.

Besonders geeignete Mikroorganismen zur Herstellung von PUFAs sind Mikroorganismen wie Thraustochytrien oder Schizochytrien-
10 Stämme, Algen wie Phaeodactylum tricornutum oder Cryptecodinium-Arten, Ciliaten, wie Stylonychia oder Colpidium, Pilze, wie Mortierella, Entomophthora oder Mucor. Durch Stammselektion ist eine Anzahl von Mutantenstämmen der entsprechenden Mikro-organismen entwickelt worden, die eine Reihe wünschenswerter Ver-
15 bindungen, einschließlich PUFAs, produzieren. Die Selektion von Stämmen mit verbesserter Produktion eines bestimmten Moleküls ist jedoch ein zeitraubendes und schwieriges Verfahren. Von Nachteil ist außerdem, daß sich mit einem definierten Mikroorganismus nur bestimmte ungesättigte Fettsäuren bzw. nur ein bestimmtes Fett-
20 säurespektrum herstellbar ist.

Alternativ kann die Produktion von Feinchemikalien geeigneter-
weise über die Produktion von Pflanzen, die so entwickelt sind,
daß sie die vorstehend genannten PUFAs herstellen, im großen
25 Maßstab durchgeführt werden. Besonders gut für diesen Zweck geeignete Pflanzen sind Ölfruchtpflanzen, die große Mengen an Lipidverbindungen enthalten wie Raps, Canola, Lein, Soja, Sonnenblumen, Borretsch und Nachtkerze. Aber auch andere Nutzpflanzen, die Öle oder Lipide und Fettsäuren enthalten, sind gut geeignet,
30 wie in der eingehenden Beschreibung dieser Erfindung erwähnt. Mittels herkömmlicher Züchtung sind eine Reihe von Mutanten-pflanzen entwickelt worden, die ein Spektrum an wünschenswerten Lipiden und Fettsäuren, Cofaktoren und Enzymen produzieren.
Die Selektion neuer Pflanzensorten mit verbesserter Produktion
35 eines bestimmten Moleküls ist jedoch ein zeitaufwendiges und schwieriges Verfahren oder sogar unmöglich, wenn die Verbindung in der entsprechenden Pflanze nicht natürlich vorkommen, wie im Fall von mehrfach ungesättigten C₂₀-Fettsäuren und C₂₂-Fettsäuren und solchen mit längeren Kohlenstoffketten.

40

Zusammenfassung der Erfindung

Die Erfindung stellt neue Nukleinsäuremoleküle bereit, die zur Identifizierung und Isolierung von Elongasegenen der PUFA-Bio-
45 synthese geeignet sind und zur Modifikation von Ölen, Fettsäuren, Lipiden, von Lipiden stammenden Verbindungen und am stärksten bevorzugt zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren ver-

wendet werden können, da nach wie vor ein großer Bedarf an neuen Genen, die für Enzyme codieren, die an der Biosynthese ungesättigter Fettsäuren beteiligt sind und es ermöglichen, diese in einem technischen Maßstab herzustellen, besteht. Insbesondere 5 besteht ein Bedarf an Fettsäurebiosyntheseenzyme, die die Elongation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren bevorzugt mit zwei oder mehr Doppelbindungen im Molekül ermöglichen. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäure codieren für Enzyme, die diese Fähigkeit besitzen.

10

Mikroorganismen, wie Phaeodactylum, Colpidium, Mortierella, Entomophthora, Mucor, Cryptothecodium sowie andere Algen und Pilze und Pflanzen, insbesondere Ölfruchtpflanzen, werden gemeinhin in der Industrie zur Produktion einer Vielzahl von Feinchemikalien 15 im großen Maßstab verwendet.

Unter der Voraussetzung der Verfügbarkeit von Klonierungsvektoren und Techniken zur genetischen Manipulation der oben genannten Mikroorganismen und Ciliaten, wie in WO 98/01572 und 20 WO 00/23604 offenbart, oder Algen und verwandten Organismen, wie Phaeodactylum tricornutum, beschrieben in Falciatore et al. [1999, Marine Biotechnology 1(3):239-251]; sowie Dunahay et al. [1995, Genetic transformation of diatoms, J. Phycol. 31:10004-1012] und den Zitaten darin, können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle zur gentechnologischen Veränderung 25 dieser Organismen verwendet werden, so daß sie bessere oder effizientere Produzenten einer oder mehrerer Feinchemikalien speziell ungesättigter Fettsäuren werden. Diese verbesserte Produktion oder Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie 30 kann durch eine direkte Wirkung der Manipulation eines erfindungsgemäßen Gens oder durch eine indirekte Wirkung dieser Manipulation hervorgerufen werden.

Moose und Algen sind die einzigen bekannten Pflanzensysteme, 35 die erhebliche Mengen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie Arachidonsäure (= ARA) und/oder Eicosapentaensäure (= EPA) und/oder Docosahexaensäure (= DHA) herstellen. Moose enthalten PUFAs in Membranlipiden während Algen, algenverwandte Organismen und einige Pilze auch nennenswerte Mengen an PUFAs in der 40 Triacylglycerolfraktion akkumulieren. Daher eignen sich Nukleinsäuremoleküle, die aus solchen Stämmen isoliert werden, die PUFAs auch in der Triacylglycerolfraktion akkumulieren, besonders zur Modifikation des Lipid- und PUFA-Produktionssystems in einem Wirt, insbesondere in Mikroorganismen, wie den vorstehend 45 erwähnten Mikroorganismen, und Pflanzen, wie Ölfruchtpflanzen, beispielsweise Raps, Canola, Lein, Soja, Sonnenblume, Borretsch, Rizinus, Ölpalme, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*), Kokosnuss,

- Erdnuß oder Kakaobohne. Ferner können Nukleinsäuren aus Triacylglycerol-akkumulierenden Mikroorganismen zur Identifikation solcher DNA-Sequenzen und Enzyme in anderen Arten, die sich zur Modifikation der Biosynthese von Vorläufermolekülen von 5 PUFAs in den entsprechenden Organismen eignen, verwendet werden. Insbesondere Mikroorganismen wie Cryptothecodium cohnii und Thraustochytrium species sind Mikroorganismen, die PUFAs wie ARA, EPA oder DHA in Triacylglycerolen akkumulieren. Thraustochytrien sind phylogenetisch auch eng verwandt mit den Schizophytrien 10 Stämmen. Obwohl diese Organismen nicht eng mit Moosen wie Physcomitrella verwandt sind, sind auf DNA-Sequenz- und insbesondere Polypeptid-Ebene Sequenzähnlichkeiten in einem solchen Maße feststellbar, daß DNA-Moleküle in heterologen Hybridsierungsexperimenten, Sequenzvergleichen und Experimenten 15 unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion auch aus evolutiv weit entfernten Organismen identifizierbar und isolierbar und funktionell charakterisierbar sind. Insbesondere lassen sich Konsensussequenzen ableiten, die sich zum heterologen Sichten oder zur funktionellen Komplementierung und Vorhersage von 20 Genfunktionen in dritten Arten eignet. Die Fähigkeit, diese Funktionen zu identifizieren, z.B. die Vorhersage der Substratspezifität von Enzymen, kann daher von signifikanter Bedeutung sein. Ferner können diese Nukleinsäuremoleküle als Bezugssequenzen zur Kartierung verwandter Genome oder zur Ableitung 25 von PCR-Primern dienen.

Die neuen Nukleinsäuremoleküle codieren für Proteine, die hier als PUFA-spezifische Elongasen (= PSEs oder im Singular PSE) bezeichnet werden. Diese PSEs können beispielsweise eine Funktion 30 ausüben, die am Stoffwechsel (z.B. an der Biosynthese oder am Abbau) von Verbindungen, die zur Lipid- oder Fettsäuresynthese notwendig sind, wie PUFAs, beteiligt sind oder am Transmembrantransport einer oder mehrerer Lipid-/Fettsäureverbindungen entweder in die oder aus der Zelle teilnehmen.

35 In dieser neuen Anmeldung wird die Isolierung solcher neuen Elongasegene eingehender dargestellt. Wir haben zum ersten Mal Elongasegene isoliert, die zur Produktion langkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren, vorzugsweise mit mehr als achtzehn oder 40 zwanzig Kohlenstoffatomen im Kohlenstoffgrundgerüst der Fettsäure und/oder mindestens zwei Doppelbindungen in der Kohlenstoffkette, geeignet sind und dabei aus typischen Organismen stammen, die hohe Mengen an PUFAs in der Triacylglycerolfraktion enthalten. Daher ist hierin im Singular von einem PSE-Gen oder -Protein die 45 Rede bzw im Plural von PSE-Genen oder -Proteinen. Andere bekannte Patentanmeldungen und Publikationen offenbaren oder zeigen kein funktionell aktives PSE-Gen, obgleich es verschiedene bekannte

Patentanmeldungen gibt, welche die Verlängerung gesättigter Fettsäuren mit kurzer oder mittlerer Kette (WO 98/46776 und US 5,475,099) oder die Verlängerung oder Produktion langkettiger Fettsäuren, die dann aber nicht mehr als eine Doppelbindung 5 haben oder zu langkettigen Fettsäure-Wachsestern führen (siehe: WO 98/54954, WO 96/13582, WO 95/15387) zeigen. Die hier vorliegende Erfindung beschreibt die Isolierung neuartiger Elongasen mit neuen Eigenschaften. Ausgehend von der in SEQ ID NO:1 genannten Sequenz konnten, weitere Nukleinsäuren, die für 10 Elongasen codieren, die ungesättigte Fettsäuren verlängern, gefunden werden.

WO 99/64616, WO 98/46763, WO 98/46764, WO 98/46765 beschreiben die Herstellung von PUFAs in transgenen Pflanzen und zeigen die 15 Klonierung und funktionelle Expression entsprechender Desaturase-Aktivitäten, insbesondere aus Pilzen, zeigen aber kein PSE-codierendes Gen und keine funktionelle PSE-Aktivität. Die Expression der Desaturase-Aktivitäten führt zu einer Verschiebung der Fettsäurezusammensetzung in den transgenen Pflanzen eine 20 Erhöhung des Gehalts an ungesättigten Fettsäuren wurde nicht beobachtet. Die Herstellung einer Triensäure mit C₁₈-Kohlenstoffkette ist gezeigt und anhand von gamma-Linolensäure beansprucht worden, es wurde jedoch bisher nicht die Herstellung sehr langkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren (mit C₂₀- und längerer 25 Kohlenstoffkette sowie von Triensäuren und höher ungesättigten Typen) gezeigt.

Zur Herstellung langkettiger PUFAs müssen die mehrfach ungesättigten C₁₆ oder C₁₈-Fettsäuren durch die enzymatische Aktivität 30 einer Elongase um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängert werden. Die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 codiert die erste Pflanzenelongase, die C₁₆ oder C₁₈-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängern kann. Nach einer 35 Elongationsrunde führt diese Enzymaktivität zu C₂₀-Fettsäuren, und nach zwei, drei und vier Elongationsrunden zu C₂₂-, C₂₄- oder C₂₆-Fettsäuren. Mit Hilfe der weiteren offenbarten Elongasen (SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11) können ebenfalls längerketige PUFAs synthetisiert 40 werden. Diese können einzeln, zu mehreren oder z.B. additiv zur PUFA Elongase aus dem Moos Physcomitrella patens (SEQ ID NO:1) zur Erhöhung des PUFA Gehaltes in einem neuen Verfahren zur Produktion von PUFAs eingesetzt werden. Die Aktivität der erfindungsgemäßen Elongasen führt vorzugsweise zu C₂₀-Fettsäuren 45 mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise mit drei oder vier Doppelbindungen, besonders bevorzugt drei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül und/oder C₂₂-Fettsäuren

mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise mit vier, fünf oder sechs Doppelbindungen, besonders bevorzugt mit fünf oder sechs Doppelbindungen im Molekül. Nachdem die Verlängerung mit dem erfindungsgemäßen Enzym stattgefunden hat, können weitere Desaturierungsschritte erfolgen, um die hoch desaturierten Fettsäuren zu erhalten. Daher führen die Produkte der Elongaseaktivitäten und der möglichen weiteren Desaturierung zu bevorzugten PUFAs mit einem höheren Desaturierungsgrad, wie Docosadiensäure, Arachidonsäure, ω 6-Eicosatrienohomo- γ -linolensäure, Eicosapentaensäure, ω 3-Eicosatriensäure, ω 3-Eicosatetraensäure, Docosapentaensäure oder Docosahexaensäure. Substrate der erfindungsgemäßen Enzymaktivität sind zum Beispiel Taxolsäure; 7,10,13-Hexadecatriensäure, 6,9-Octadecadiensäure, Linolsäure, Pinolensäure, α -oder γ -Linolensäure oder Stearidonsäure sowie Arachidonsäure, Eicosatetraensäure, Docosapentaensäure, Eicosapentaensäure. Bevorzugte Substrate sind Linolsäure, γ -Linolensäure und/oder α -Linolensäure sowie Arachidonsäure, Eicosatetraensäure, Docosapentaensäure, Eicosapentaensäure. Besonders bevorzugt sind Arachidonsäure, Docosapentaensäure, Eicosapentaensäure. Die C₁₆ oder C₁₈-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure können durch die erfindungsgemäße enzymatische Aktivität in Form der freien Fettsäure oder in Form der Ester, wie Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide, Phosphoglyceride, Monoacylglycerin, Diacylglycerin oder Triacylglycerin, verlängert werden.

Für die menschliche Ernährung ist konjugierte Linolsäure "CLA" von besonderer Bedeutung. Unter CLA versteht man insbesondere Fettsäuren wie C18:2 ^{9 cis, 11 trans} oder das Isomer C18:2 ^{10 trans, 12 cis}, die aufgrund menschlicher Enzymsysteme nach Aufnahme im Körper desaturiert bzw. elongiert werden können und zu gesundheitsfördernden Effekten beitragen können. Mit erfindungsgemäßen Elongasen können auch solche konjugierten Fettsäuren mit wenigstens zwei Doppelbindungen im Molekül elongiert werden und damit solche gesundheitsfördernden Fettsäuren der menschlichen Ernährung zugeführt werden. Weitere Beispiel für konjugierte Fettsäuren sind alpha-Parinarsäure, Eleostearinsäure und Calendulasäure.

Unter der Voraussetzung von Klonierungsvektoren zur Verwendung in Pflanzen und bei der Pflanzentransformation, wie denjenigen, die veröffentlicht sind in und dort zitiert sind: Plant Molecular Biology and Biotechnology (CRC Press, Boca Raton, Florida), Kapitel 6/7, S. 71-119 (1993); F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, 15-38; B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization,

Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225)), lassen sich die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren zur gentechnologischen Veränderung eines breiten Spektrums an Pflanzen verwenden, so daß diese ein besserer, effizienterer oder veränderter Produzent eines oder mehrerer von Lipiden hergeleiteter Produkte, wie PUFAs, wird. Diese verbesserte Produktion oder Effizienz der Produktion eines von Lipiden hergeleiteten Produktes, wie PUFAs, kann durch direkte Wirkung der Manipulation oder eine indirekte Wirkung dieser Manipulation hervorgerufen werden.

Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die die Veränderung eines erfindungsgemäßen PSE-Proteins die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie aus einer Ölfruchtpflanze oder einem Mikroorganismus aufgrund eines veränderten Proteins direkt beeinflussen kann. Die Anzahl oder Aktivität des PSE-Proteins oder -Gens kann erhöht sein, so daß größere Mengen dieser Verbindungen de novo hergestellt werden, weil den Organismen diese Aktivität und Fähigkeit zur Biosynthese vor dem Einbringen des entsprechenden Gens fehlte. Auch die Verwendung verschiedener divergenter, d.h. auf DNA-Sequenzebene unterschiedlicher Sequenzen kann dabei vorteilhaft sein.

Das Einbringen eines PSE-Gens oder mehrerer PSE-Gene in einen Organismus oder eine Zelle kann nicht nur den Biosyntheseefluß zum Endprodukt erhöhen, sondern auch die entsprechende Triacylglycerin-Zusammensetzung erhöhen oder de novo schaffen. Ebenso kann die Anzahl oder Aktivität anderer Gene, die am Import von Nährstoffen, die zur Biosynthese einer oder mehrerer Feinchemikalien (z.B. Fettsäuren, polaren und neutralen Lipiden) nötig sind, erhöht sein, so daß die Konzentration dieser Vorläufer, Cofaktoren oder Zwischenverbindungen innerhalb der Zellen oder innerhalb des Speicherkompartiments erhöht ist, wodurch die Fähigkeit der Zellen zur Produktion von PUFAs, wie im folgenden beschrieben, weiter gesteigert wird. Fettsäuren und Lipide sind selbst als Feinchemikalien wünschenswert; durch Optimierung der Aktivität oder Erhöhung der Anzahl einer oder mehrerer PSEs, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Zerstören der Aktivität einer oder mehrerer PSEs, die am Abbau dieser Verbindungen beteiligt sind, kann es möglich sein, die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Fettsäure- und Lipidmolekülen aus Pflanzen oder Mikroorganismen zu steigern.

Die Mutagenese des erfindungsgemäßen PSE-Gens kann auch zu einem PSE-Protein mit geänderten Aktivitäten führen, welche die Produktion einer oder mehrerer gewünschter Feinchemikalien direkt oder indirekt beeinflussen. Beispielsweise kann die Anzahl oder 5 Aktivität des erfindungsgemäßen PSE-Gene gesteigert werden, so daß die normalen Stoffwechselabfälle oder -nebenprodukte der Zelle (deren Menge möglicherweise aufgrund der Überproduktion der gewünschten Feinchemikalie erhöht ist) effizient exportiert werden, bevor sie andere Moleküle oder Prozesse innerhalb der 10 Zelle (welche die Lebensfähigkeit der Zelle senken würden) zerstören oder die Biosynthesewege der Feinchemikalie stören würden (wodurch die Ausbeute, Produktion oder Effizienz der Produktion der gewünschten Feinchemikalie verringert wird). Ferner können die relativ großen intrazellulären Mengen der gewünschten Fein- 15 chemikalie selbst toxisch für die Zelle sein oder Enzym-Rückkopplungsmechanismen, wie die allosterische Regulation, stören, beispielsweise könnte sie durch Steigerung der Aktivität oder Anzahl anderer stromabwärts folgender Enzyme oder Entgiftungsenzyme des PUFA-Wegs die Allokation der PUFA in die Triacylglycerin- 20 Fraktion steigern, man könnte die Lebensfähigkeit von Saatzellen erhöhen, was wiederum zu besserer Entwicklung von Zellen in Kultur oder zu Saaten führt, die die gewünschte Feinchemikalie produzieren. Das erfindungsgemäße PSE-Gen kann auch so manipuliert werden, daß die entsprechenden Mengen der verschiedenen 25 Lipid- und Fettsäuremoleküle hergestellt werden. Dies kann eine einschneidende Wirkung auf die Lipidzusammensetzung der Membran der Zelle haben und erzeugt neue Öle zusätzlich zum Auftreten neusynthetisierter PUFAs. Da jeder Lipidtyp unterschiedliche physikalische Eigenschaften hat, kann eine Veränderung der Lipid- 30 zusammensetzung einer Membran die Membranfluidität erheblich verändern. Änderungen der Membranfluidität können sich auf den Transport von Molekülen über die Membran sowie auf die Unversehrtheit der Zelle auswirken, die beide eine entscheidende Wirkung auf die Produktion von Feinchemikalien besitzen. In 35 Pflanzen können diese Änderungen überdies auch andere Merkmale, wie Toleranz gegenüber abiotischen und biotischen Stresssituationen, beeinflussen.

Biotische und abiotische Streßtoleranz ist ein allgemeines Merkmal, das man an ein breites Spektrum von Pflanzen, wie Mais, 40 Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Sojabohne, Erdnuß, Baumwolle, Raps und Canola, Maniok, Pfeffer, Sonnenblume und Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, 45 Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölpalme, Kokosnuß) und ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte, vererben möchte. Diese Feldfrüchte sind als weitere erfindungsgemäße Ausführungsform

auch bevorzugte Zielpflanzen für die Gentechnologie. Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Pflanzen sind Ölfruchtpflanzen, wie Sojabohne, Erdnuß, Raps, Canola, Sonnenblume, Safflor, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss) oder Feldfrüchte, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Alfalfa, oder Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee).

Folglich betrifft ein Aspekt der Erfindung isolierte Nuklein-säuremoleküle (z.B. cDNAs), umfassend Nukleotidsequenzen, die eine PSE oder mehrere PSEs oder biologisch aktive Teile davon codieren, oder Nukleinsäurefragmente, die sich als Primer oder Hybridisierungssonden zum Nachweis oder zur Amplifikation PSE-codierender Nukleinsäuren (z.B. DNA oder mRNA) eignen. Bei besonders bevorzugten Ausführungsformen umfaßt das Nukleinsäure-molekül eine der in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 dargestellten Nukleotidsequenzen oder die codierende Region oder ein Komplement einer dieser Nukleotidsequenzen. Bei anderen besonders bevor-zugten Ausführungsformen umfaßt das erfindungsgemäße isolierte Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz, die an eine Nukleotid-sequenz, wie in der Sequenz SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 dar-gestellt, oder einen Teil davon hybridisiert oder zu mindestens etwa 50 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 %, 80 % oder 90 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr dazu ist. Bei anderen bevorzugten Ausführungsformen codiert das isolierte Nukleinsäuremolekül eine der in der Sequenz SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12 dargestellten Aminosäuresequenzen. Das bevorzugte erfindungsgemäße PSE-Gen besitzt vorzugsweise auch mindestens eine der hier beschriebenen PSE-Aktivitäten.

Bei einer weiteren Ausführungsform codiert das isolierte Nukleinsäuremolekül ein Protein oder einen Teil davon, wobei das Protein oder der Teil davon eine Aminosäuresequenz enthält, die ausreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12 ist, daß das Protein oder der Teil davon eine PSE-Aktivität beibehält. Vorzugsweise behält das Protein oder der Teil davon, das/der von dem Nukleinsäuremolekül codiert wird, die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen von Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilzunehmen. Bei einer Ausführungsform ist das von dem Nukleinsäuremolekül codierte Protein zu mindestens etwa 50 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 % und stärker bevor-zugt mindestens etwa 70 %, 80 % oder 90 % und am stärksten bevor-

10

zugt mindestens etwa 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr homolog zu einer Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform 5 ist das Protein ein Vollängen-Protein, das im wesentlichen in Teilen homolog zu einer gesamten Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12 (die von dem in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 gezeigten 10 offenen Leserahmen herröhrt) ist und in Vollänge mit dem Fachmann geläufigen Methoden und Experimenten isolierbar ist.

Bei einer anderen bevorzugten Ausführungsform röhrt das isolierte Nukleinsäuremoleköl von *Phytophthora infestans*, *Physcomitrella 15 patens*, *Cryptothecodium cohnii* oder *Thraustochytrium her und codiert ein Protein (z.B. ein PSE-Fusionsprotein), das eine biologisch aktive Domäne enthält, die zu mindestens etwa 50 % oder mehr homolog zu einer Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und 20 SEQ ID NO:12 ist und die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen von Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilzunehmen, beibehält oder zumindest eine der Elongationsaktivitäten resultierend in PUFAs wie ARA, EPA oder DHA oder deren Vorläufer- 25 moleküle oder eine der in der Tabelle 1 aufgeführten Aktivitäten besitzt, und umfaßt auch heterologe Nukleinsäuresequenzen, die ein heterologes Polypeptid oder regulatorische Proteine codieren.*

Tabelle 1: Fettsäuremuster von fünf transgenen Hefestämmen in 30 Mol.-%. Die Anteile der zugeführten und aufgenommenen α -Linolensäure sind durch fettgedruckte Zahlen hervorgehoben, die der verlängerten Produkte sind unterstrichen und die der verlängerten γ -Linolensäure durch fettgedruckte Zahlen (letzte Zeile). 35

Fettsäuren [Mol.-%]	pYES2	py2PSE1a	py2PSE1b	py2PSE1c	py2PSE1d
16:0	17,0	17,6	16,4	16,3	17,6
16:1 Δ^9	28,0	26,8	28,0	27,9	25,1
18:0	6,5	6,0	6,4	5,6	6,1
18:1 Δ^9	25,9	23,5	27,0	25,2	21,4
18:3 $\Delta^{6,9,12}$	22,6	15,7	13,2	16,4	22,8
20:3 $\Delta^{8,11,14}$	-	10,3	9,0	8,6	7,1
18:3 $\Delta^{6,9,12}$ -Elongation	-	39,6	40,5	34,4	23,7

45

Bei einer anderen Ausführungsform ist das isolierte Nukleinsäuremolekül mindestens 15 Nukleotide lang und hybridisiert unter stringenten Bedingungen an ein Nukleinsäuremolekül, das eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, 5 SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 enthält. Vorzugsweise entspricht das isolierte Nukleinsäuremolekül einem natürlich vorkommenden Nukleinsäuremolekül. Stärker bevorzugt codiert das isolierte Nukleinsäuremolekül natürlich vorkommende Cryptechodinium-, Phytophthora- oder Thraustochytrium-PSE oder einen 10 biologisch aktiven Teil davon.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Vektoren, z.B. rekombinante Expressionsvektoren, die mindestens ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül enthalten, und Wirtszellen, in die 15 diese Vektoren eingebracht worden sind, insbesondere Mikroorganismen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe, -organe oder ganze Pflanzen. Bei einer Ausführungsform kann eine solche Wirtszelle Feinchemikalien-Verbindungen, insbesondere PUFAs, speichern; zur Isolation der gewünschten Verbindung werden die Zellen geerntet. 20 Die Verbindung (Öle, Lipide, Triacylglyceride, Fettsäuren) oder die PSE können dann aus dem Medium oder der Wirtszelle, welche bei Pflanzen Zellen sind, die Feinchemikalien enthalten oder speichern, am stärksten bevorzugt Zellen von Speichergeweben, wie Samenhüllen, Knollen, Epidermis- und Samenzellen, isoliert 25 werden.

Noch ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft eine genetisch veränderte Pflanze, bevorzugt ein Ölfruchtpflanze, wie vorstehend erwähnt, besonders bevorzugt eine Raps-, Lein- oder 30 Physcomitrella patens-Pflanze, in die ein PSE-Gen eingebracht worden ist. Bei einer Ausführungsform ist das Genom von Raps, Lein oder Physcomitrella patens durch Einbringen eines erfindungsgemäßigen Nukleinsäuremoleküls, das eine Wildtyp- oder mutierte PSE-Sequenz codiert, als Transgen verändert worden. 35 Bei einer anderen Ausführungsform ist ein endogenes PSE-Gen im Genom der Spenderorganismen Physcomitrella patens, Phytophthora infestans, Cryptechodinium oder Thraustochytrium beispielsweise durch homologe Rekombination mit einem veränderten PSE-Gen oder Mutagenese und Detektion mittels DNA-Sequenzen verändert, das 40 heißt funktionell zerstört worden. Bei einer bevorzugten Ausführungsform gehört der Pflanzenorganismus zur Gattung Physcomitrella, Ceratodon, Funaria, Raps oder Lein, wobei Physcomitrella, Raps oder Lein bevorzugt ist. Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird Physcomitrella, Raps oder Lein auch zur 45 Produktion einer gewünschten Verbindung, wie Lipiden und Fettsäuren, wobei PUFAs besonders bevorzugt sind, verwendet.

12

Bei noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann das Moos Physcomitrella patens zur Demonstration der Funktion eines Elongasegens unter Verwendung homologer Rekombination auf der Basis der in dieser Erfindung beschriebenen Nukleinsäuren ver-
wendet werden.

Noch ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein isoliertes PSE-Gen oder einen Teil, z.B. einen biologisch aktiven Teil, davon. Bei einer bevorzugten Ausführungsform kann die isolierte
10 PSE oder ein Teil davon am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in einem Mikroorganismus oder einer Pflanzenzelle notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über dessen/deren Membranen teilnehmen. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die isolierte PSE oder der Teil davon aus-
15 reichend homolog zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12 das dieses Protein oder der Teil davon die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Mikro-organismen oder Pflanzenzellen notwendigen Verbindungen oder am
20 Transport von Molekülen über diese Membranen teilzunehmen, bei- behält.

Die Erfindung stellt auch eine isolierte Präparation einer PSE bereit. Bei bevorzugten Ausführungsformen umfaßt das PSE-Gen eine
25 Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein isoliertes Vollängenprotein, das im wesentlichen homolog zu einer gesamten Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6,
30 SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12 (die von den in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 gezeigten offenen Leserahmen codiert werden) ist. Bei einer weiteren Ausführungsform ist das Protein zu min- destens etwa 50 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 % und stärker
35 bevorzugt mindestens etwa 70 %, 80 % oder 90 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr homolog zu einer Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12. Bei anderen Ausführungsformen umfaßt die isolierte
40 PSE eine Aminosäuresequenz, die zu mindestens etwa 50 % homolog zu einer der Aminosäuresequenzen der SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12 ist und am Stoffwechsel von zum Aufbau von Fettsäuren in einem Mikro-organismus oder einer Pflanzenzelle notwendigen Verbindungen oder
45 am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann oder eine oder mehrere der PUFA-verlängernden Aktivitäten hat, wobei die Verlängerung vorteilhaft von desaturierten C₁₆ oder

· C₁₈- oder C₂₀-Kohlenstoffketten mit Doppelbindungen an mindestens zwei Stellen erfolgt.

Alternativ kann die isolierte PSE eine Aminosäuresequenz um-
5 fassen, die von einer Nukleotidsequenz codiert wird, die an eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 hybridisiert, z.B. unter stringenten Bedingungen hybridisiert, oder zu mindestens etwa 50 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 %, stärker bevorzugt
10 mindestens etwa 70 %, 80 % oder 90 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr homolog dazu ist. Es ist ebenfalls bevorzugt, daß die bevorzugten PSE-Formen ebenfalls eine der hier beschriebenen PSE-Aktivitäten besitzen.

15 Das PSE-Polypeptid oder ein biologisch aktiver Teil davon kann funktionsfähig mit einem nicht-PSE-Polypeptid verbunden werden, so daß ein Fusionsprotein gebildet wird. Bei bevorzugten Ausführungsformen hat dieses Fusionsprotein eine Aktivität, die
20 sich von derjenigen der PSE allein unterscheidet. Bei anderen bevorzugten Ausführungsform nimmt dieses Fusionsprotein am Stoffwechsel von Verbindungen, die zur Synthese von Lipiden und Fettsäuren, Cofaktoren und Enzymen in Mikroorganismen oder Pflanzen notwendig sind, oder am Transport von Molekülen über diese
25 Membranen teil. Bei besonders bevorzugten Ausführungsformen moduliert das Einbringen dieses Fusionsproteins in eine Wirtszelle die Produktion einer gewünschten Verbindung durch die Zelle. Bei einer bevorzugten Ausführungsform enthalten diese Fusionsproteine auch Δ4-, Δ5- oder Δ6-, Δ8-, Δ15-, Δ17- oder
30 Δ19-Desaturase-Aktivitäten allein oder in Kombination.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer Feinchemikalie. Dieses Verfahren beinhaltet entweder die Züchtung eines geeigneten Mikroorganismus oder
35 die Züchtung von Pflanzenzellen, -geweben, -organen oder ganzen Pflanzen, umfassend die erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen der SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 oder ihre Homologen, Derivate oder Analoga oder ein Genkonstrukt, das die SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5,
40 SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 oder ihre Homologen, Derivate oder Analoga umfaßt, oder einen Vektor, der diese Sequenzen oder das Genkonstrukt umfaßt, welches die Expression eines erfindungsgemäßen PSE-Nukleinsäuremoleküls herbeiführt, so daß eine Feinchemikalie produziert wird. Bei einer bevorzugten
45 Ausführungsform umfaßt das Verfahren ferner den Schritt des Gewinnens einer Zelle, die eine solche erfindungsgemäße Elongase-Nukleinsäuresequenz enthält, wobei eine Zelle mit einer Elongase-

14

Nukleinsäuresequenz, einem Genkonstrukt oder einem Vektor, welche die Expression einer erfindungsgemäßen PSE-Nukleinsäure herbeiführen, transformiert wird. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt dieses Verfahren ferner den Schritt des

5 Gewinnens der Feinchemikalie aus der Kultur. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform gehört die Zelle zur Ordnung der Ciliaten, zu Mikroorganismen, wie Pilzen, oder zum Pflanzenreich, insbesondere zu Ölfruchtpflanzen, besonders bevorzugt sind Mikroorganismen oder Ölfruchtpflanzen.

10 Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Verfahren zur Modulation der Produktion eines Moleküls durch einen Mikroorganismus. Diese Verfahren umfassen das Zusammenbringen der Zelle mit einer Substanz, welche die PSE-Aktivität oder die

15 PSE-Nukleinsäureexpression moduliert, so daß eine zellassoziierte Aktivität relativ zu der gleichen Aktivität in Abwesenheit der Substanz verändert wird. Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird/werden ein oder zwei Stoffwechselweg(e) der Zelle für Lipide und Fettsäuren, Cofaktoren und Enzyme moduliert oder der Transport von Verbindungen über diese Membranen moduliert, so daß die Ausbeute oder die Rate der Produktion einer gewünschten Feinchemikalie durch diesen Mikroorganismus verbessert ist. Die Substanz, welche die PSE-Aktivität moduliert, kann eine Substanz sein, welche die PSE-Aktivität oder PSE-Nukleinsäureexpression

20 stimuliert oder die als Zwischenprodukt bei der Fettsäurebiosynthese verwendet werden kann. Beispiele für Substanzen, welche die PSE-Aktivität oder PSE-Nukleinsäureexpression stimulieren, sind u.a. kleine Moleküle, aktive PSEs sowie PSEs-codierende Nukleinsäuren, die in die Zelle eingebracht worden sind. Bei-

25 spielt für Substanzen, welche die PSE-Aktivität oder -Expression hemmen, sind u.a. kleine Moleküle und/oder Antisense-PSE-Nuklein-säuremoleküle.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Verfahren zur

30 Modulation der Ausbeuten einer gewünschten Verbindung aus einer Zelle, umfassend das Einbringen eines Wildtyp- oder Mutanten-PSE-Gens, das entweder auf einem separaten Plasmid gehalten oder in das Genom der Wirtszelle integriert wird, in eine Zelle. Bei Integration in das Genom kann die Integration zufallsgemäß sein

35 oder durch derartige Rekombination erfolgen, daß das native Gen durch die eingebrachte Kopie ersetzt wird, wodurch die Produktion der gewünschten Verbindung durch die Zelle moduliert wird, oder durch Verwendung eines Gens in trans, so daß das Gen mit einer funktionellen Expressionseinheit, welche mindestens eine die

40 Expression eines Gens gewährleistende Sequenz und mindestens

45 Expression eines Gens gewährleistende Sequenz und mindestens

15

eine die Polyadenylierung eines funktionell transkribierten Gens gewährleistende Sequenz enthält, funktionell verbunden ist.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform sind die Ausbeuten 5 modifiziert. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die gewünschte Chemikalie vermehrt, wobei unerwünschte störende Verbindungen vermindert werden können. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die gewünschte Feinchemikalie ein Lipid oder eine Fettsäure, ein Cofaktor oder ein Enzym. Bei 10 besonders bevorzugten Ausführungsform ist diese Chemikalie eine mehrfach ungesättigte Fettsäure. Stärker bevorzugt ist sie ausgewählt aus Arachidonsäure (= ARA), Eicosapentaensäure (= EPA) oder Docosahexaensäure (= DHA).

15 Eingehende Beschreibung der Erfindung

Die vorliegende Erfindung stellt PSE-Nukleinsäuren und -Proteinmoleküle bereit, die am Stoffwechsel von Lipiden und Fettsäuren, PUFA-Cofaktoren und Enzymen in dem Moos *Physcomitrella patens*, 20 *Phytophthora infestans*, *Cryptothecodium* oder *Traustochytrium* oder am Transport lipophiler Verbindungen über Membranen beteiligt sind. Die erfindungsgemäßen Verbindungen lassen sich zur Modulation der Produktion von Feinchemikalien aus Organismen, beispielsweise Mikroorganismen, wie Ciliaten, Pilzen, Hefen, 25 Bakterien, Algen, und/oder Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Sojabohne, Erdnuß, Baumwolle, Brassica-Arten, wie Raps, Canola und Rübsen, Pfeffer, Sonnenblume, Borretsch, Nachtkerze und Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, 30 Maniok, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss) und ausdauernden Gräsern und Futterfeldfrüchten, entweder direkt (z.B. wenn die Überexpression oder Optimierung eines Fettsäurebiosynthese-Proteins einen direkten Einfluß auf die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der 35 Produktion der Fettsäure aus modifizierten Organismen hat) verwenden oder können eine indirekt Auswirkung haben, die dennoch zu einer Steigerung der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Verbindung oder einer Abnahme unerwünschter Verbindungen führt (z.B. wenn die Modulation des Stoff- 40 wechsels von Lipiden und Fettsäuren, Cofaktoren und Enzymen zu Veränderungen der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion oder der Zusammensetzung der gewünschten Verbindungen innerhalb der Zellen führt, was wiederum die Produktion einer oder mehrerer Feinchemikalien beeinflussen kann). Aspekte der 45 Erfindung sind nachstehend weiter erläutert.

I. Feinchemikalien und PUFAs

Der Begriff "Feinchemikalie" ist im Fachgebiet bekannt und umfaßt Moleküle, die durch einen Organismus produziert werden
5 sind und Anwendungen in verschiedenen Industrien finden, wie, aber nicht beschränkt auf, die pharmazeutische, Landwirtschafts-, Nahrungsmittel- und Kosmetik-Industrie. Diese Verbindungen umfassen Lipide, Fettsäuren, Cofaktoren und Enzyme usw. (wie z.B. beschrieben in Kuninaka, A. (1996) Nucleotides
10 and related compounds, S. 561-612, in Biotechnology Bd. 6, Rehm et al., Hrsgb., VCH: Weinheim und darin enthaltenen Literaturstellen), Lipide, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (z.B. Arachidonsäure), Vitamine und Cofaktoren (wie beschrieben in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A27,
15 Vitamins, S. 443-613 (1996) VCH: Weinheim und darin enthaltenen Literaturstellen; und Ong, A.S., Niki, E., & Packer, L. (1995) Nutrition, Lipids, Health and Disease Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asien,
20 abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press (1995)), Enzyme und sämtliche anderen von Gutcho (1983) in Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086, und darin angegebenen Literaturstellen beschriebenen Chemikalien. Der Stoffwechsel und die Verwendungen bestimmter
25 Feinchemikalien sind nachstehend weiter erläutert.

Die Kombination verschiedener Vorläufermoleküle und Biosyntheseenzyme führt zur Herstellung verschiedener Fettsäuremoleküle, was eine entscheidende Auswirkung auf die Zusammensetzung der Membran
30 hat. Es kann angenommen werden, daß PUFAs nicht nur einfach in Triacylglycerin, sondern auch in Membranlipide eingebaut werden.

Die Synthese von Membranen ist ein gut charakterisierter Prozeß, an dem eine Anzahl von Komponenten, einschließlich Lipiden als
35 Teil der Bilayer-Membran, beteiligt sind. Die Produktion neuer Fettsäuren, wie PUFAs, kann daher neue Eigenschaften von Membranfunktionen innerhalb einer Zelle oder eines Organismus erzeugen.

Zellmembranen dienen einer Vielzahl von Funktionen in einer
40 Zelle. Zuerst und in erster Linie grenzt eine Membran den Inhalt einer Zelle von der Umgebung ab, wodurch sie der Zelle Integrität verleiht. Membranen können auch als Schranken gegenüber dem Einstrom gefährlicher oder unerwünschter Verbindungen und auch gegenüber dem Ausstrom gewünschter Verbindungen dienen.

17

Detailliertere Beschreibungen und Beteiligungen von Membranen und die beteiligten Mechanismen siehe in: Bamberg, E., et al. (1993) Charge transport of ion pumps on lipid bilayer membranes, Q. Rev. Biophys. 26:1-25; Gennis, R.B. (1989) Pores, Channels 5 and Transporters, in: Biomembranes, Molecular Structure and Function, Springer: Heidelberg, S. 270-322; und Nikaido, H., und Saier, H. (1992) Transport proteins in bacteria: common themes in their design, Science 258:936-942, und den in jeder dieser Literaturstellen enthaltenen Zitaten.

10

Die Lipidsynthese läßt sich in zwei Abschnitte unterteilen: die Synthese von Fettsäuren und ihre Bindung an sn-Glycerin-3-Phosphat sowie die Addition oder Modifikation einer polaren Kopfgruppe. Übliche Lipide, die in Membranen verwendet werden, 15 umfassen Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide und Phosphoglyceride. Die Fettsäuresynthese beginnt mit der Umwandlung von Acetyl-CoA entweder in Malonyl-CoA durch die Acetyl-CoA-Carboxylase oder in Acetyl-ACP durch die Acetyltransacylase. Nach einer Kondensationsreaktion bilden diese beiden Produktmoleküle 20 zusammen Acetoacetyl-ACP, das über eine Reihe von Kondensations-, Reduktions- und Dehydratisierungsreaktionen umgewandelt wird, so daß ein gesättigtes Fettsäuremolekül mit der gewünschten Kettenlänge erhalten wird. Die Produktion der ungesättigten Fettsäuren aus diesen Molekülen wird durch spezifische Desaturasen katalysiert, und zwar entweder aerob mittels molekularem Sauerstoff 25 oder anaerob (bezüglich der Fettsäuresynthese in Mikroorganismen siehe F.C. Neidhardt et al. (1996) *E. coli* und *Salmonella*. ASM Press: Washington, D.C., S. 612-636 und darin enthaltene Literaturstellen; Lengeler et al. (Hrsgb.) (1999) *Biology of 30 Prokaryotes*. Thieme: Stuttgart, New York, und die enthaltene Literaturstellen, sowie Magnuson, K., et al. (1993) Microbiological Reviews 57:522-542 und die enthaltenen Literaturstellen).

35 Vorläufer für die PUFA-Biosynthese sind beispielsweise Linol- und Linolensäure. Diese C₁₈-Kohlenstoff-Fettsäuren müssen auf C₂₀ oder C₂₂ verlängert werden, damit Fettsäuren vom Eicos- und Docosa-Kettentyp erhalten werden. Mit Hilfe verschiedener Desaturasen, wie Enzymen, welche Δ6-Desaturase-, Δ5- und 40 Δ4-Desaturaseaktivität aufweisen, können Arachidonsäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure sowie verschiedene andere langkettige PUFAs erhalten, extrahiert und für verschiedene Zwecke bei Nahrungsmittel-, Futter-, Kosmetik- oder pharmazeutischen Anwendungen verwendet werden.

45

Zur Herstellung langkettiger PUFAs müssen, wie oben erwähnt, die mehrfach ungesättigten C₁₆ oder C₁₈- bzw C₂₀-Fettsäuren um mindestens zwei Kohlenstoffatome durch die Enzymaktivität einer Elongase verlängert werden. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen codieren erste mikrobielle Elongasen aus typischen PUFA in der Triacylglycerolfraktion enthaltenden Produzenten, die C₁₆ oder C₁₈- bzw C₂₀-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängern können oder dies z.B. sequentiell nacheinander durch Überführen einer C₁₆ oder C₁₈-Fettsäure in eine C₂₀-Fettsäure und dann eine C₂₀- in eine C₂₂ oder höhere geradzahlige 2C-Atomeinheiten enthaltende Fettsäure überführt. Nach einer Elongationsrunde führt diese Enzymaktivität zu C₂₀-Fettsäuren, und nach zwei, drei und vier Elongationsrunden zu C₂₂-, C₂₄- oder C₂₆-Fettsäuren. Mit der erfindungsgemäßen Elongase können auch längere PUFAs synthetisiert werden. Die Aktivität der erfindungsgemäßen Elongasen führt vorzugsweise zu C₂₀- und/oder C₂₂-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, C₂₀-Fettsäuren vorzugsweise mit drei, vier oder fünf Doppelbindungen, besonders bevorzugt drei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, C₂₂-Fettsäuren vorzugsweise mit drei, vier fünf oder sechs Doppelbindungen, besonders bevorzugt fünf oder sechs Doppelbindungen im Fettsäuremolekül. Nach der Elongation mit dem erfindungsgemäßen Enzym können weitere Desaturierungsschritte erfolgen. Daher führen die Produkte der Elongaseaktivitäten und der möglichen weiteren Desaturierung zu bevorzugten PUFAs mit höherem Desaturierungsgrad, wie Docosadiensäure, Arachidonsäure, ω6-Eicosatrieni-homo-γ-linolensäure, Eicosapentaensäure, ω3-Eicosatriensäure, ω3-Eicosatetraensäure, Docosapentaensäure oder Docosahexaensäure.

Substrate dieser erfindungsgemäßen Enzymaktivität sind zum Beispiel Taxolsäure, 7,10,13-Hexadecatriensäure, 6,9-Octadecadiensäure, Linolsäure, γ-Linolensäure, Pinolensäure, α-Linolensäure, Arachidonsäure, Eicosapentaensäure oder Stearidonsäure. Bevorzugte Substrate sind Linolsäure, γ-Linolensäure und/oder α-Linolensäure bzw Arachidonsäure, Eicosatetraensäure oder Eicosapentaensäure. Die C₁₆ oder C₁₈-oder C₂₀-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure können durch die erfindungsgemäße Enzymaktivität in Form der freien Fettsäure oder in Form der Ester, wie Phospholipide, Glykolipide, Sphingolipide, Phosphoglyceride, Monoacylglycerin, Diacylglycerin oder Triacylglycerin, verlängert werden.

Ferner müssen Fettsäuren anschließend an verschiedene Modifikationen transportiert und in das Triacylglycerin-Speicherlipid eingebaut werden. Ein weiterer wichtiger Schritt bei der Lipidsynthese ist der Transfer von Fettsäuren auf die

polaren Kopfgruppen, beispielsweise durch Glycerin-Fettsäure-Acyltransferase (siehe Frentzen, 1998, Lipid, 100(4-5):161-166).

- Veröffentlichungen über die Pflanzen-Fettsäurebiosynthese,
- 5 Desaturierung, den Lipidstoffwechsel und Membrantransport von fetthaltigen Verbindungen, die Betaoxidation, Fettsäuremodifikation und Cofaktoren, Triacylglycerin-Speicherung und -Assemblierung einschließlich der Literaturstellen darin siehe in den folgenden Artikeln: Kinney, 1997, Genetic Engeneering,
- 10 Hrsgb.: JK Setlow, 19:149-166; Ohlrogge und Browse, 1995, Plant Cell 7:957-970; Shanklin und Cahoon, 1998, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49:611-641; Voelker, 1996, Genetic Engeneering, Hrsgb.: JK Setlow, 18:111-13; Gerhardt, 1992, Prog. Lipid R. 31:397-417; Gühnemann-Schäfer & Kindl, 1995, Biochim.
- 15 Biophys Acta 1256:181-186; Kunau et al., 1995, Prog. Lipid Res. 34:267-342; Stymne et al., 1993, in: Biochemistry and Molecular Biology of Membrane and Storage Lipids of Plants, Hrsgb.: Murata und Somerville, Rockville, American Society of Plant Physiologists, 150-158, Murphy & Ross 1998, Plant Journal.
- 20 13(1):1-16.

- Vitamine, Cofaktoren und "Nutraceuticals", wie PUFAs, umfassen eine Gruppe von Molekülen, die höhere Tiere nicht mehr synthetisieren können und somit aufnehmen müssen oder die höhere Tiere
- 25 nicht mehr ausreichend selbst herstellen können und somit zusätzlich aufnehmen müssen, obwohl sie leicht von anderen Organismen, wie Bakterien, synthetisiert werden. Die Biosynthese dieser Moleküle in Organismen, die sie produzieren können, wie in Bakterien, ist im großen und ganzen charakterisiert worden (Ullmann's
- 30 Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996; Michal, G. (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley & Sons; Ong, A.S., Niki, E., & Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the
- 35 UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research Asia, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press, Champaign, IL X, 374 S).
- 40 Die oben erwähnten Moleküle sind entweder selbst biologisch aktive Moleküle oder Vorstufen biologisch aktiver Substanzen, die entweder als Elektronenüberträger oder Zwischenprodukte bei einer Vielzahl von Stoffwechselwegen dienen. Diese Verbindungen haben neben ihrem Nährwert auch einen signifikanten industriellen Wert
- 45 als Farbstoffe, Antioxidantien und Katalysatoren oder andere Verarbeitungshilfsstoffe. (Einen Überblick über Struktur, Aktivität und industrielle Anwendungen dieser Verbindungen siehe z.B.

20

- in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996). Mehrfach ungesättigte Fettsäuren haben verschiedene Funktionen und gesundheitsfördernde Wirkungen, beispielsweise bei koronarer Herzerkrankung, Entzündungsmechanismen, Kinderernährung usw. Veröffentlichungen und Literaturstellen, einschließlich darin zitierter Literaturstellen, siehe in: Simopoulos, 1999, Am. J. Clin. Nutr. 70 (3. Suppl.):560-569, Takahata et al., Biosc. Biotechnol. Biochem. 1998, 62(11):2079-2085, Willich und Winther, 1995, Deutsche Medizinische Wochenschrift 120(7):229ff.

II. Elemente und Verfahren der Erfindung

- Die vorliegende Erfindung beruht zumindest teilweise auf der Entdeckung neuer Moleküle, die hier als PSE-Nukleinsäure- und -Proteinmoleküle bezeichnet werden, welche eine Wirkung auf die Produktion von Zellmembranen in *Physcomitrella patens*, *Cryptocodon cohnii*, *Phytophthora infestans*, *Thraustochytrium* und/oder *Ceratodon purpureus* ausüben und beispielsweise die Bewegung von Molekülen über diese Membranen beeinflussen. Bei einer Ausführungsform nehmen die PSE-Moleküle am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Organismen, wie Mikroorganismen und Pflanzen, notwendigen Verbindungen teil oder beeinflussen indirekt den Transport von Molekülen über diese Membranen. Bei einer bevorzugten Ausführungsform hat die Aktivität der erfindungsgemäßen PSE-Moleküle zur Regulation der Produktion von Membrankomponenten und des Membrantransports eine Auswirkung auf die Produktion der gewünschten Feinchemikalie durch diesen Organismus. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Aktivität der erfindungsgemäßen PSE-Moleküle moduliert, so daß die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der Stoffwechselwege von Mikroorganismen oder Pflanzen, welche die erfindungsgemäßen PSEs regulieren, moduliert sind und die Effizienz des Transport von Verbindungen durch die Membranen verändert ist, was entweder direkt oder indirekt die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Feinchemikalie durch Mikroorganismen und Pflanzen moduliert.
- Der Begriff PSE oder PSE-Polypeptid umfaßt Proteine, die am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Organismen, wie Mikroorganismen und Pflanzen, notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen. Beispiele für PSEs sind in der SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 oder ihren Homologen, Derivaten oder Analoga offenbart. Die Begriffe PSE oder PSE-Nukleinsäuresequenz(en) umfassen Nukleinsäuresequenzen, die

eine PSE codieren und bei denen ein Teil eine codierende Region und ebenfalls entsprechende 5'- und 3'-untranslatierte Sequenzbereiche sein können. Beispiele für PSE-Gene sind die in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 5 und SEQ ID NO:11 dargestellten Sequenzen. Die Begriffe Produktion oder Produktivität sind im Fachgebiet bekannt und beinhalten die Konzentration des Fermentationsproduktes (zum Beispiel der gewünschten Feinchemikalie), das in einer bestimmten Zeitspanne und einem bestimmten Fermentationsvolumen gebildet wird (z.B. 10 kg Produkt pro Stunde pro Liter). Der Begriff Effizienz der Produktion umfaßt die Zeit, die zur Erzielung einer bestimmten Produktionsmenge nötig ist (z.B. wie lange die Zelle zur Aufführung einer bestimmten Durchsatzrate einer Feinchemikalie benötigt). Der Begriff Ausbeute oder Produkt/Kohlenstoff-Ausbeute 15 ist im Fachgebiet bekannt und umfaßt die Effizienz der Umwandlung der Kohlenstoffquelle in das Produkt (d.h. die Feinchemikalie). Dies wird gewöhnlich beispielsweise ausgedrückt als kg Produkt pro kg Kohlenstoffquelle. Durch Erhöhen der Ausbeute oder Produktion der Verbindung wird die Menge der gewonnenen Moleküle 20 oder der geeigneten gewonnenen Moleküle dieser Verbindung in einer bestimmten Kulturmenge über einen festgelegten Zeitraum erhöht. Die Begriffe Biosynthese oder Biosyntheseweg sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Synthese einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine Zelle aus 25 Zwischenverbindungen, beispielsweise in einem Mehrschritt- und stark regulierten Prozeß. Die Begriffe Abbau oder Abbauweg sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Spaltung einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine Zelle in Abbauprodukte (allgemeiner gesagt, kleinere oder weniger 30 komplexe Moleküle) beispielsweise in einem Mehrschritt- und stark regulierten Prozeß. Der Begriff Stoffwechsel ist im Fachgebiet bekannt und umfaßt die Gesamtheit der biochemischen Reaktionen, die in einem Organismus stattfinden. Der Stoffwechsel einer bestimmten Verbindung (z.B. der Stoffwechsel einer Fettsäure) 35 umfaßt dann die Gesamtheit der Biosynthese-, Modifikations- und Abbauwege dieser Verbindung in der Zelle, die diese Verbindung betreffen.

Bei einer anderen Ausführungsform können die erfindungsgemäßen 40 PSE-Moleküle die Produktion eines gewünschten Moleküls, wie einer Feinchemikalie, in einem Mikroorganismus oder in Pflanzen modulieren. Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die die Veränderung einer erfindungsgemäßen PSR die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie aus 45 einem Mikroorganismus- oder Pflanzenstamm, die dieses veränderte Protein enthalten, direkt beeinflussen kann. Die Anzahl oder Aktivität von PSEs, die am Transport von Feinchemikalienmolekülen

innerhalb oder aus der Zelle beteiligt sind, kann erhöht werden, so daß größere Mengen dieser Verbindungen über Membranen transportiert werden, aus denen sie leichter gewonnen und ineinander umgewandelt werden. Ferner sind Fettsäuren, Triacylglycerine und/oder Lipide selbst wünschenswerte Feinchemikalien; durch Optimierung der Aktivität oder Steigern der Anzahl einer oder mehrerer erfindungsgemäßer PSEs, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Stören der Aktivität einer oder mehrerer PSEs, die am Abbau dieser Verbindungen beteiligt sind, kann es möglich sein, die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Fettsäure- und Lipidmolekülen aus Organismen, wie Mikroorganismen oder Pflanzen, zu erhöhen.

Die Mutagenese des erfindungsgemäßen PSE-Gens kann auch PSEs mit veränderten Aktivitäten hervorbringen, welche die Produktion einer oder mehrerer gewünschter Feinchemikalien aus Mikroorganismen oder Pflanzen indirekt beeinflussen. Beispielsweise können erfindungsgemäße PSEs, die am Export von Abfallprodukten beteiligt sind, eine größere Anzahl oder höhere Aktivität aufweisen, so daß die normalen Stoffwechselabfälle der Zelle (deren Menge möglicherweise aufgrund der Überproduktion der gewünschten Feinchemikalie erhöht ist) effizient exportiert werden, bevor sie die Moleküle in der Zelle schädigen können (was die Lebensfähigkeit der Zelle herabsetzen würde) oder die Feinchemikalien-Biosynthesewege stören können (was die Ausbeute, Produktion oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Feinchemikalie senken würde). Die relativ großen intrazellulären Mengen der gewünschten Feinchemikalie selbst können ferner für die Zelle toxisch sein, so daß man durch Steigern der Aktivität oder Anzahl von Transportern, die diese Verbindungen aus der Zelle exportieren können, die Lebensfähigkeit der Zelle in Kultur steigern kann, was wiederum zu einer größeren Anzahl an Zellen in der Kultur führt, welche die gewünschte Feinchemikalie produzieren. Die erfindungsgemäßen PSEs können auch so manipuliert werden, daß die entsprechenden Mengen unterschiedlicher Lipid- und Fettsäuremoleküle produziert werden. Dies kann eine erhebliche Auswirkung auf die Lipidzusammensetzung der Zellmembran haben. Da jeder Lipidtyp unterschiedliche physikalische Eigenschaften aufweist, kann eine Veränderung der Lipidzusammensetzung einer Membran die Membranfluidität signifikant verändern. Änderungen der Membranfluidität können den Transport von Molekülen über die Membran sowie die Integrität der Zelle beeinflussen, was jeweils eine erhebliche Auswirkung auf die Produktion von Feinchemikalien aus Mikroorganismen und Pflanzen in Fermentationskultur im großen Maßstab hat. Pflanzenmembranen verleihen spezifische Eigenschaften, wie Toleranz gegenüber Wärme, Kälte, Salz, Trockenheit sowie

Toleranz gegen Pathogene, wie Bakterien und Pilze. Daher kann die Modulation der Membrankomponenten eine grundlegende Wirkung auf die Überlebensfähigkeit der Pflanzen unter den oben genannten Stressparametern haben. Dies kann über Änderungen in Signal-5 kaskaden oder direkt über die veränderte Membranzusammensetzung erfolgen (siehe zum Beispiel: Chapman, 1998, Trends in Plant Science, 3(11):419-426) und Signalkaskaden (siehe Wang 1999, Plant Physiology, 120:645-651) oder die Kältetoleranz, wie offenbart in WO 95/18222, beeinflussen.

10 Die erfindungsgemäßen isolierten Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise im Genom eines Thraustochytrium-Stamms enthalten, der über die American Type Culture Collection (ATCC-Sammlung) mit der Stammmnummer ATCC26185 (Thraustochytrium) verfügbar ist, bzw 15 im Fall von Cryptecodinium beispielsweise vom Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton ((CCMP) West Boothbay Harbour, ME, USA) mit der Stammkultur-Nr. CCMP316 zugänglich ist. Im Fall der Phytophthora infestans sind die genannten Nukleinsäuremoleküle aus dem Stamm ATCC 48886 isoliert.

20 Die Nukleotidsequenz der isolierten Physcomitrella-, Cryptecodinium-, Phytophthora infestans- oder Thraustochytrium-cDNA und die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Physcomitrella patens-PSEs sind in den SEQ ID NO:1 bis SEQ ID NO:12 gezeigt. Es wurden 25 Computeranalysen durchgeführt, die diese Nukleotidsequenzen als Sequenzen klassifizieren und/oder identifizieren, die am Stoffwechsel von Zellmembrankomponenten beteiligte Proteine oder am Transport von Verbindungen über Zellmembranen beteiligte Proteine bzw. der PUFA Biosynthese codieren. EST's mit der Datenbankein-30 gabe-Nr. PP001019019F, CC001042041R, PI001002014R sowie TC002034029R, TC002034029R-11 und TC002014093R in der Datenbank des Erfinders stellen die erfindungsgemäßen Sequenzen in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 dar. Auf analoge Weise wurden die partiellen 35 Polypeptide als PP001019019F, CC001042041R, PI001002014R sowie TC002034029R, TC002034029R-11 und TC002014093R bezeichnet und stellen die erfindungsgemäßen Sequenzen in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12 gemäß Tabelle 2 dar. Das vollständige Fragment-40 Insert des ESTs TC002034029R wurde sequenziert und ergab die SEQ ID NO:3, welche die vollständige Sequenz von TC002034029R ist. TC002034029R-11 beschreibt eine Volllängensequenz einer Elongase aus Thraustochytrium. Die Namensgebung der übrigen Klone ist analog. Zudem wurde den verschiedenen Klonen Gennamen entsprechend zugewiesen. Abkürzungen: Tc = Thraustochytrium, Cc = Cryptecodinium, Pp = Physcomitrella patens, Pi = Phytophthora infestans.

Tabelle 2

	Bezeichnung est-Name	Genname	Polypeptid SEQ ID NO	Nukleinsäure SEQ ID NO
5	PP001019019F	Pp_PSE1	2	1
	TC002034029R	Tc_PSE1	4	3
	TC002014093R	Tc_PSE2	6	5
	CC001042041R	Cc_PSE1	8	7
	TC002034029R-11	Tc_PSE1_1	10	9
	PI001002014R	Pi_PSE1	12	11

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Proteine mit einer Aminosäuresequenz, die im wesentlichen homolog zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12 ist. Wie hier verwendet, ist ein Protein mit einer Aminosäuresequenz, die im wesentlichen homolog zu einer ausgewählten Aminosäuresequenz ist, zu mindestens etwa 50 % homolog zu der ausgewählten Aminosäuresequenz, z.B. der gesamten ausgewählten Aminosäuresequenz. Ein Protein mit einer Aminosäuresequenz, die im wesentlichen homolog zu einer ausgewählten Aminosäuresequenz ist, kann auch zu mindestens etwa 50 bis 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 70 % und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 % oder 90 bis 95 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr homolog zu einer ausgewählten Aminosäuresequenz sein.

Die erfindungsgemäße PSE oder der biologisch aktive Teil oder das Fragment davon kann am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Mikroorganismen oder Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen oder eine oder mehrere der zur Elongation von C₁₆ oder C₁₈-bzw C₂₀-PUFAs benötigten Aktivitäten besitzen, so daß C₂₀-, C₂₂- oder C₂₄-PUFAs sowie verwandte PUFAs erhalten werden.

verschiedene Aspekte der Erfindung sind eingehender in den folgenden Unterabschnitten beschrieben.

A. Isolierte Nukleinsäuremoleküle

Eine Ausführungsform der Erfindung sind isolierte Nukleinsäuren, die von PUFA produzierenden Mikroorganismen stammen und für Polypeptide codieren, die C₁₆ oder C₁₈-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängern oder C₂₀-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängern.

25

Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform sind isolierte Nukleinsäuren, umfassend Nukleotidsequenzen, die für Polypeptide codieren, die C₁₆, C₁₈- oder C₂₀-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure verlängern und ausgewählt ist 5 aus der Gruppe, bestehend aus

- a) den in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 dargestellten Nukleinsäuresequenzen,
- 10 b) einer Nukleinsäuresequenz, die gemäß dem degenerierten genetischen Code von einer der in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 dargestellten Sequenzen stammt, oder
- 15 c) Derivate der in 7SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 dargestellten Sequenz, die für Polypeptide der in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12 dargestellten Aminosäuresequenz codieren und mindestens 20 50 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist.

25 Die oben genannten erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, die als C₁₆-, C₁₈- oder C₂₀-Elongase wirken, stammen von Organismen, wie Ciliaten, Pilzen, Algen, Pflanzen oder Dinoflagellaten, die PUFAs synthetisieren können, vorzugsweise von Pflanzen oder Algen, besonders bevorzugt aus der Gattung Phytophthora, 30 Physcomitrella, Cryptecodinium, Thraustochytrium oder Schizophytrium und am stärksten bevorzugt von Phytophthora infestans, Physcomitrella patens, Cryptecodinium cohnii oder Thraustochytrium sp., Schizophytrium sp. oder nah verwandten Organismen.

35 Ein Aspekt der Erfindung betrifft isolierte Nukleinsäuremoleküle, die PSE-Polypeptide oder biologisch aktive Teile davon codieren, sowie Nukleinsäurefragmente, die zur Verwendung als Hybridisierungssonden oder Primer zur Identifizierung oder Amplifizierung einer PSE-codierenden Nukleinsäure (z.B. PSE-DNA) ausreichend. Der Begriff "Nukleinsäuremolekül", wie hier verwendet, soll DNA-Moleküle (z.B. cDNA oder genomische DNA) und RNA-Moleküle (z.B. mRNA) sowie DNA- oder RNA-Analoga, die mittels Nukleotidanaloga erzeugt werden, umfassen. Dieser Begriff umfaßt zudem die am 3'- und am 5'-Ende des codierenden Genbereichs gelegene 40 untranslatierte Sequenz: mindestens etwa 100 Nukleotide der Sequenz stromaufwärts des 5'-Endes des codierenden Bereichs und mindestens etwa 20 Nukleotide der Sequenz stromabwärts des 45

3'-Endes des codierenden Genbereichs. Das Nukleinsäuremolekül kann einzelsträngig oder doppelsträngig sein, ist aber vorzugsweise doppelsträngige DNA. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül wird von anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der 5 natürlichen Quelle der Nukleinsäure vorliegen. Eine "isolierte" Nukleinsäure hat vorzugsweise keine Sequenzen, welche die Nukleinsäure in der genomischen DNA des Organismus, aus dem die Nukleinsäure stammt, natürlicherweise flankieren (z.B. Sequenzen, die sich an den 5'- und 3'-Enden der Nukleinsäure befinden). Bei 10 verschiedenen Ausführungsformen kann das isolierte PSE-Nukleinsäuremolekül zum Beispiel weniger als etwa 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb oder 0,1 kb an Nukleotidsequenzen enthalten, die natürlicherweise das Nukleinsäuremolekül in der genomischen DNA der Zelle, aus der die Nukleinsäure stammt (z.B. eine 15 Physcomitrella patens-Zelle) flankieren. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül, wie ein cDNA-Molekül, kann überdies im wesentlichen frei von anderem zellulären Material oder Kulturmöglichkeit sein, wenn es durch rekombinante Techniken hergestellt wird, oder frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien 20 sein, wenn es chemisch synthetisiert wird.

Ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, z.B. ein Nukleinsäuremolekül mit einer Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 oder 25 eines Teils davon, kann unter Verwendung molekularbiologischer Standardtechniken und der hier bereitgestellten Sequenzinformation isoliert werden. Auch kann mit Hilfe von Vergleichsalgorithmen beispielsweise eine homologe Sequenz oder homologe, konservierte Sequenzbereiche auf DNA oder Aminosäureebene identifiziert werden. Beispielsweise kann eine Phytophthora-, Physcomitrella-, Cryptecodinium- oder Thraustochytrium-cDNA aus einer Phytophthora, Physcomitrella-, Cryptecodinium- oder Thraustochtrium-Bank isoliert werden, indem die vollständige SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und/oder 30 SEQ ID NO:11 oder ein Teil davon als Hybridisierungssonde sowie Standard-Hybridisierungstechniken (wie z.B. beschrieben in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) verwendet werden. Überdies 35 lässt sich ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine vollständige Sequenz der SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 oder einen Teil davon, durch Polymerasekettenreaktion isolieren, wobei Oligonukleotidprimer, die auf der Basis dieser Sequenz oder von Teilen davon, insbesondere Regionen um His-Box-Motive der SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12 erstellt werden oder Modifikationen ebensolcher in einzelnen definierten 40 45

- Aminosäuren, verwendet werden (z.B. kann ein Nukleinsäuremolekül, umfassend die vollständigen Sequenz der SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 oder einen Teil davon, durch Polymerasekettenreaktion unter Verwendung von 5 Oligonukleotidprimern isoliert werden, die auf der Basis dieser gleichen Sequenz der SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 erstellt worden sind). Weiterhin sind hierfür besonders geeignet solche Teilsequenzen, wie sie in Figur 10 dargestellt sind. Zum Beispiel läßt sich 10 mRNA aus Zellen isolieren (z.B. durch das Guanidiniumthiocyanat-Extraktionsverfahren von Chirgwin et al. (1979) Biochemistry 18:5294-5299) und cDNA mittels Reverser Transkriptase (z.B. Moloney-MLV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von Gibco/BRL, Bethesda, MD, oder AMV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von 15 Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL) herstellen. Synthetische Oligonukleotidprimer zur Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion lassen sich auf der Basis einer der in SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9 oder 11 gezeigten Nukleotidsequenzen oder mit Hilfe der in Figur 10 dargestellten Aminosäuresequenzen 20 erstellen. Eine erfindungsgemäße Nukleinsäure kann unter Verwendung von cDNA oder alternativ von genomischer DNA als Matrize und geeigneten Oligonukleotidprimern gemäß Standard-PCR-Amplifikationstechniken amplifiziert werden. Die so amplifizierte Nukleinsäure kann in einen geeigneten Vektor kloniert werden 25 und mittels DNA-Sequenzanalyse charakterisiert werden. Oligonukleotide, die einer PSE-Nukleotidsequenz entsprechen, können durch Standard-Syntheseverfahren, beispielsweise mit einem automatischen DNA-Synthesegerät, hergestellt werden.
- 30 Die in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 gezeigte cDNA umfaßt Sequenzen, die PSEs codieren, (d.h. den "codierenden Bereich") sowie 5'-untranslatierte Sequenzen und 3'-untranslatierte Sequenzen. Alternativ kann das Nukleinsäuremolekül nur den codierenden Bereich 35 einer der Sequenzen in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 umfassen oder kann ganze genomische Fragmente, die aus genomischer DNA isoliert sind, enthalten.
- 40 Die SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12 wird durch die gleiche EST-Eingabenummer-Bezeichnung identifiziert, wie SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11, so daß sie leicht korreliert werden können.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül ein Nuklein-säuremolekül, das ein Komplement einer der in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und 5 SEQ ID NO:11 gezeigten Nukleotidsequenzen oder eines Teils davon ist. Ein Nukleinsäuremolekül, das zu einer der in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 gezeigten Nukleotidsequenzen komplementär ist, ist dann ausreichend komplementär, wenn es mit einer der in 10 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 angegebenen Sequenzen hybridisieren kann, wodurch ein stabiler Duplex entsteht.

Homologe der neuen Elongase-Nukleinsäuresequenzen mit der Sequenz 15 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 bedeutet beispielsweise allelische Varianten mit mindestens etwa 50 bis 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 70 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 % oder 90 bis 95 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 20 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr Homologie zu einer in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 gezeigten Nukleotidsequenzen oder ihren Homo-logen, Derivaten oder Analoga oder Teilen davon. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt ein isoliertes 25 erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz, die an eine der in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 gezeigten Nukleotid-sequenzen oder einen Teil davon hybridisiert, z.B. unter strin-genten Bedingungen hybridisiert. Allelische Varianten umfassen 30 insbesondere funktionelle Varianten, die sich durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus/in der in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 dargestellten Sequenz erhalten lassen, wobei aber die Absicht ist, daß die Enzymaktivität der davon herr-35 ührenden synthetisierten Proteine für die Insertion eines oder mehrerer Gene vorteilhafterweise beibehalten wird. Proteine, die noch die enzymatische Aktivität der Elongase besitzen, bedeutet Proteine mit mindestens 10 %, vorzugsweise 20 %, besonders bevorzugt 30 %, ganz besonders bevorzugt 40 % 40 der ursprünglichen Enzymaktivität, verglichen mit dem durch SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12 codierten Protein. Elongasen, noch die vorgenannten Aktivitäten aufweisen, sind Elongasen deren enzymatische Aktivität nicht wesentlich reduziert sind.

Homologen der SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 bedeutet beispielsweise auch bakterielle, Pilz- und Pflanzenhomologen, verkürzte Sequenzen, einzelsträngige DNA oder RNA der codierenden und nicht-codierenden DNA-Sequenz.

Homologen der SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 bedeutet auch Derivate, wie beispielsweise Promotorvarianten. Die Promotoren stromaufwärts der angegebenen Nukleotidsequenzen können durch einen oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) modifiziert werden, ohne daß jedoch die Funktionalität oder Aktivität der Promotoren gestört wird. Es ist weiterhin möglich, daß die Aktivität der Promotoren durch Modifikation ihrer Sequenz erhöht ist oder daß sie vollständig durch aktiver Promotoren, sogar aus heterologen Organismen, ersetzt werden.

Überdies kann das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül nur einen Teil des codierenden Bereichs einer der Sequenzen in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 umfassen, zum Beispiel ein Fragment, das als Sonde oder Primer verwendet werden kann, oder ein Fragment, welches einen biologisch aktiven Abschnitt einer PSE codiert. Die aus der Klonierung des PSE-Gens von *Physcomitrella patens*, *Phytophthora infestans*, *Thraustochytrium* und *Cryptocodonium* ermittelten Nukleotidsequenzen ermöglichen die Erzeugung von Sonden und Primern, die zur Identifizierung und/oder Klonierung von PSE-Homologen in anderen Zelltypen und Organismen sowie PSE-Homologen aus anderen Moosen oder verwandten Arten gestaltet sind. Die Sonde/der Primer umfaßt gewöhnlich im wesentlichen gereinigtes Oligonukleotid. Das Oligonukleotid umfaßt gewöhnlich einen Nukleotidsequenzbereich, der unter stringenten Bedingungen an mindestens etwa 12, vorzugsweise etwa 16, stärker bevorzugt etwa 25, 40, 50 oder 75 aufeinanderfolgende Nukleotide eines Sense-Stranges einer der in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 angegebenen Sequenzen, eines Antisense-Stranges einer der in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 angegebenen Sequenzen oder seiner Homologen, Derivate oder Analoga oder natürlich vorkommender Mutanten davon hybridisiert. Primer auf der Basis einer Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 können in PCR-Reaktionen zur Klonierung von PSE-Homologen verwendet werden. Sonden auf der Basis der PSE-Nukleotidsequenzen können zum Nachweis von Transkripten oder genomischen Sequenzen, die das gleiche oder homologe Proteine codieren, verwendet werden. Bei bevorzugten Ausführungsformen

umfaßt die Sonde zudem eine daran gebundene Markierungsgruppe, z.B. ein Radioisotop, eine fluoreszierende Verbindung, ein Enzym oder einen Enzym-Cofaktor. Diese Sonden können als Teil eines Test-Kits für genomische Marker zur Identifizierung von Zellen, 5 die eine PSE misexprimieren, beispielsweise durch Messen einer Menge einer PSE-codierenden Nukleinsäure in einer Zellenprobe, z.B. Messen der PSE-mRNA-Spiegel, oder zur Bestimmung, ob ein genomisches PSE-Gen mutiert oder deletiert ist, verwendet werden.

10 Bei einer Ausführungsform codiert das erfindungsgemäße Nuklein-säuremolekül ein Protein oder einen Teil davon, das/der eine Aminosäuresequenz umfaßt, die ausreichend homolog zu einer Amino-säuresequenz der SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12 ist, daß das Protein 15 oder der Teil davon die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Mikroorganismen oder Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilzunehmen, beibehält. Wie hier verwendet, betrifft der Begriff "ausreichend homolog" Proteine oder Teile davon, deren Amino- 20 säuresequenzen eine minimale Anzahl identischer oder äquivalenter Aminosäurereste (z.B. einen Aminosäurerest mit einer ähnlichen Seitenkette, wie ein Aminosäurerest in einer der Sequenzen der SEQ ID NO:2 bis 12) zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und 25 SEQ ID NO:12 aufweisen, so daß das Protein oder der Teil davon am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Mikro-organismen oder Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Trans- port von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann. Protein-bestandteile dieser Stoffwechselwege für Membrankomponenten 30 oder Membrantransportsysteme können, wie hier beschrieben, eine Rolle bei der Produktion und Sekretion einer oder mehrerer Fein-chemikalien spielen. Beispiele für diese Aktivitäten sind hier ebenfalls beschrieben. Somit trägt die "Funktion einer PSE" ent- weder direkt oder indirekt zur Ausbeute, Produktion und/oder 35 Effizienz der Produktion einer oder mehrerer Feinchemikalien bei. Beispiele für PSE-Substratspezifitäten der katalytischen Aktivität sind in Tabelle 1 angegeben.

Bei einer weiteren Ausführungsform codieren Derivate des 40 erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls Proteine mit mindestens etwa 50 bis 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 70 % und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 %, 90 bis 95 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr Homologie zu einer vollständigen 45 Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12. Die Homologie der Aminosäuresequenz wurde über den gesamten Sequenzbereich mit dem

Programm PileUp (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5, 1989:151-153) oder BESTFIT oder GAP bestimmt (Henikoff, S. and Henikoff, J. G. (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5 10915-10919.)

Teile von Proteinen, die von den erfindungsgemäßen PSE-Nuklein-säuremolekülen codiert werden, sind vorzugsweise biologisch aktive Teile einer der PSEs. Wie hier verwendet, soll der Begriff 10 "biologisch aktiver Teil einer PSE", einen Abschnitt, z.B. eine Domäne/ein Motiv, einer PSE umfassen, der am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Mikroorganismen oder Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann oder eine in Tabelle 1 ange- 15 gebene Aktivität aufweist. Zur Bestimmung, ob eine PSE oder ein biologisch aktiver Teil davon am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Mikroorganismen oder Pflanzen notwendigen Ver- bindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann, kann ein Test der enzymatischen Aktivität durch- 20 geführt werden. Diese Testverfahren, wie eingehend in Beispiel 8 des Beispielteils beschrieben, sind dem Fachmann geläufig.

Zusätzliche Nukleinsäurefragmente, die biologisch aktive Abschnitte einer PSE codieren, lassen sich durch Isolierung 25 eines Teils einer der Sequenzen in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12, Exprimieren des codierten Abschnitt der PSE oder des Peptids (z.B. durch rekombinante Expression in vitro) und Bestimmen 30 der Aktivität des codierten Teils der PSE oder des Peptids herstellen.

Die Erfindung umfaßt zudem Nukleinsäuremoleküle, die sich von einer der in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 gezeigten Nukleotid- 35 sequenzen (und Teilen davon) aufgrund des degenerierten genetischen Codes unterscheiden und somit die gleiche PSE codieren wie diejenige, die von den in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 gezeigten Nukleotid- sequenzen codiert wird. Bei einer anderen Ausführungsform hat ein 40 erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül eine Nukleotid- sequenz, die ein Protein mit einer in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12 gezeigten Aminosäuresequenz codiert. Bei einer weiteren Ausführungsform codiert das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül ein Vollängen- 45 PSE-Protein, das zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12 (die von einem in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3,

SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 gezeigten offenen Leseraster codiert wird) im wesentlichen homolog ist und durch gängige Methoden identifizierbar und isolierbar ist.

- 5 Zusätzlich zu den in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 gezeigten PSE-Nukleotidsequenzen erkennt der Fachmann, daß DNA-Sequenzpolymorphismen, die zu Änderungen in den Aminosäuresequenzen der PSEs führen, innerhalb einer Population (z.B. der Physcomitrella-
10 Phytophthora-, Cryptecodinium- oder Thraustochytrium-Population) existieren können. Diese genetischen Polymorphismen im PSE-Gen können zwischen Individuen innerhalb einer Population aufgrund von natürlicher Variation existieren. Wie hier verwendet, bedeuten die Begriffe "Gen" und "rekombinantes Gen" Nukleinsäure-
15 moleküle mit einem offenen Leserahmen, der eine PSE, vorzugsweise eine Phytophthora, Physcomitrella, Cryptecodinium- oder Thraustochytrium -PSE, codiert. Diese natürlichen Varianten bewirken üblicherweise eine Varianz von 1 bis 5 % in der Nukleotidsequenz des PSE-Gens. Sämtliche und alle dieser Nukleotid-
20 variationen und daraus resultierende Aminosäurepolymorphismen in PSE, die das Ergebnis natürlicher Variation sind und die funktionelle Aktivität von PSEs nicht verändern, sollen im Umfang der Erfindung enthalten sein.

25 Nukleinsäuremoleküle, die den natürlichen Varianten entsprechen, und nicht Physcomitrella-, Phytophthora-, Cryptecodinium- oder Thraustochytrium -Homologen, -Derivate und -Analoga der Phytophthora-, Physcomitrella-, Cryptecodinium- oder Thraustochytrium -cDNA können auf der Grundlage ihrer Homologie zu der
30 hier offenbarten Phytophthora-, Physcomitrella-, Cryptecodinium- oder Thraustochytrium -PSE-Nukleinsäure unter Verwendung der Physcomitrella-, Phytophthora-, Cryptecodinium- oder Thraustochytrium-cDNA oder eines Teils davon als Hybridisierungssonde gemäß Standard-Hybridisierungstechniken unter stringenten
35 Hybridisierungsbedingungen isoliert werden. Bei einer anderen Ausführungsform ist ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül mindestens 15 Nukleotide lang und hybridisiert unter stringenten Bedingungen mit dem Nukleinsäuremolekül, das eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5,
40 SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 umfaßt. Bei anderen Ausführungsformen ist die Nukleinsäure mindestens 25, 50, 100, 250 oder mehr Nukleotide lang. Der Begriff "hybridisiert unter stringenten Bedingungen", wie hier verwendet, soll Hybridisierungs- und Waschbedingungen beschreiben, unter denen
45 Nukleotidsequenzen, die mindestens 60 % homolog zueinander sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Die Bedingungen sind vorzugsweise derart, daß Sequenzen, die mindestens etwa 65 %,

stärker bevorzugt mindestens etwa 70 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 75 % oder stärker zueinander homolog sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Diese stringenten Bedingungen sind dem Fachmann bekannt und lassen sich in Current 5 Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6., finden. Ein bevorzugtes, nicht einschränkendes Beispiel für stringenten Hybridisierungsbedingungen sind Hybridisierungen in 6 x Natriumchlorid/Natriumcitrat (sodium chloride/ sodium citrate = SSC) bei etwa 45°C, gefolgt von einem oder 10 mehreren Waschschriften in 0,2 x SSC, 0,1 % SDS bei 50 bis 65°C. Dem Fachmann ist bekannt, daß diese Hybridisierungsbedingungen sich je nach dem Typ der Nukleinsäure und, wenn beispielsweise organische Lösungsmittel vorliegen, hinsichtlich der Temperatur und der Konzentration des Puffers unterscheiden. Die Temperatur 15 unterscheidet sich beispielsweise unter "Standard-Hybridisierungsbedingungen" je nach dem Typ der Nukleinsäure zwischen 42°C und 58°C in wäßrigem Puffer mit einer Konzentration von 0,1 bis 5 x SSC (pH 7,2). Falls organisches Lösungsmittel im oben- genannten Puffer vorliegt, zum Beispiel 50 % Formamid, ist die 20 Temperatur unter Standardbedingungen etwa 42°C. Vorzugsweise sind die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride zum Beispiel 0,1 x SSC und 20°C bis 45°C, vorzugsweise zwischen 30°C und 45°C. Vorzugsweise sind die Hybridisierungsbedingungen für DNA:RNA- 25 Hybride zum Beispiel 0,1 x SSC und 30°C bis 55°C, vorzugsweise zwischen 45°C und 55°C. Die vorstehend genannten Hybridisierungs- temperaturen sind beispielsweise für eine Nukleinsäure mit etwa 100 bp (= Basenpaare) Länge und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von Formamid bestimmt. Der Fachmann weiß, wie die erforderlichen Hybridisierungsbedingungen anhand von Lehrbüchern, 30 wie dem vorstehend erwähnten oder aus den folgenden Lehrbüchern Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; Hames und Higgins (Hrsgb.) 1985, "Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (Hrsgb.) 1991, "Essential 35 Molecular Biology: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford, bestimmt werden können.

Vorzugsweise entspricht ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül, das unter stringenten Bedingungen an eine 40 Sequenz der SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 hybridisiert, einem natürlich vorkommenden Nukleinsäuremolekül. Wie hier verwendet, betrifft ein "natürlich vorkommendes" Nukleinsäuremolekül ein RNA- oder DNA- Molekül mit einer Nukleotidsequenz, die in der Natur vorkommt 45 (z.B. ein natürliches Protein codiert). Bei einer Ausführungs- form codiert die Nukleinsäure eine natürliche vorkommende

· *Physcomitrella patens*-PSE, *Phytophthora infestans*-PSE, *Cryptocodium cohnii*-PSE oder *Thraustochytrium*-PSE.

Zusätzlich zu natürlich vorkommenden Varianten der PSE-Sequenz,
5 die in der Population existieren können, erkennt der Fachmann
ferner, daß auch Änderungen durch Mutation in eine Nukleotid-
sequenz der SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7,
SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 eingebracht werden können, was
zu Änderungen der Aminosäuresequenz der codierten PSE führt,
10 ohne daß die Funktionsfähigkeit des PSE-Proteins beeinträchtigt
wird. Beispielsweise lassen sich Nukleotidsubstitutionen, die an
"nicht-essentiellen" Aminosäureresten zu Aminosäuresubstitutionen
führen, in einer Sequenz der SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3,
SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 her-
15 stellen. Ein "nicht-essentieller" Aminosäurerest ist ein Rest,
der sich in einer Wildtypsequenz einer der PSEs (SEQ ID NO:2,
SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und
SEQ ID NO:12) verändern läßt, ohne daß die Aktivität der PSE
verändert wird, wohingegen ein "essentieller" Aminosäurerest für
20 die PSE-Aktivität erforderlich ist. Andere Aminosäurereste (z.B.
diejenigen, die in der Domäne mit PSE-Aktivität nicht konserviert
oder lediglich semikonserviert sind) können jedoch für die
Aktivität nicht essentiell sein und lassen sich somit wahr-
scheinlich verändern, ohne daß die PSE-Aktivität verändert wird.

25 Folglich betrifft ein weiterer Aspekt der Erfindung Nukleinsäure-
moleküle, die PSEs codieren, die veränderte Aminosäurerreste ent-
halten, die für die PSE-Aktivität nicht essentiell sind. Diese
PSEs unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz von einer
30 Sequenz in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8,
SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12 und behalten dennoch zumindest
eine der hier beschriebenen PSE-Aktivitäten. Das isolierte
Nukleinsäuremolekül umfaßt bei einer Ausführungsform eine
Nukleotidsequenz, die ein Protein codiert, wobei das Protein eine
35 Aminosäuresequenz mit mindestens etwa 50 % Homologie zu einer
Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6,
SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12 umfaßt und am
Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in *Phytophthora*,
Physcomitrella, *Cryptocodium*- oder *Thraustochytrium* not-
40 wendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese
Membranen teilnehmen kann. Das von dem Nukleinsäuremolekül
codierte Protein ist vorzugsweise mindestens etwa 50 bis 60 %
homolog zu einer der Sequenzen in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4,
SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12 stärker
45 bevorzugt mindestens etwa 60 bis 70 % homolog zu einer der
Sequenzen in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8,
SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12 noch stärker bevorzugt mindestens

etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 %, 90 bis 95 % homolog zu einer der Sequenzen in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12 und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96 %, 97 %, 98 % oder 99 % homolog zu einer der 5 Sequenzen in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12.

Zur Bestimmung der prozentualen Homologie von zwei Aminosäuresequenzen (z.B. einer der Sequenzen der SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, 10 SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12 und einer mutierten Form davon) oder von zwei Nukleinsäuren werden die Sequenzen zum Zweck des optimalen Vergleichs untereinander geschrieben (z.B. können Lücken in die Sequenz eines Proteins oder einer Nukleinsäure eingefügt werden, um ein optimales 15 Alignment mit dem anderen Protein oder der anderen Nukleinsäure zu erzeugen). Die Aminosäurereste oder Nukleotide an den entsprechenden Aminosäurepositionen oder Nukleotidpositionen werden dann verglichen. Wenn eine Position in einer Sequenz (z.B. einer der Sequenzen der SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, 20 SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12) durch den gleichen Aminosäurerest oder das gleiche Nukleotid wie die entsprechende Stelle in der anderen Sequenz (z.B. einer mutierten Form der aus SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12 ausgewählten Sequenz) belegt wird, dann sind 25 die Moleküle an dieser Position homolog (d.h. Aminosäure- oder Nukleinsäure- "Homologie", wie hier verwendet, entspricht Aminosäure- oder Nukleinsäure- "Identität"). Die prozentuale Homologie zwischen den beiden Sequenzen ist eine Funktion der Anzahl an identischen Positionen, die den Sequenzen gemeinsam sind (d.h. 30 % Homologie = Anzahl der identischen Positionen/Gesamtanzahl der Positionen x 100).

Ein isoliertes Nukleinsäuremolekül, das eine PSE codiert, die zu einer Proteinsequenz der SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, 35 SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12 homolog ist, kann durch Einbringen einer oder mehrerer Nukleotidsubstitutionen, -additionen oder -deletionen in eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 erzeugt werden, so daß eine oder mehrere Amino- 40 säuresubstitutionen, -additionen oder -deletionen in das codierte Protein eingebracht werden. Mutationen können in eine der Sequenzen der SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 durch Standardtechniken, wie stellenspezifische Mutagenese und PCR-vermittelte Mutagenese, 45 eingebracht werden. Vorzugsweise werden konservative Aminosäuresubstitutionen an einer oder mehreren der vorhergesagten nicht-essentiellen Aminosäureresten hergestellt. Bei einer "konser-

vativen Aminosäuresubstitution" wird der Aminosäurerest gegen einen Aminosäurerest mit einer ähnlichen Seitenkette ausgetauscht. Im Fachgebiet sind Familien von Aminosäureresten mit ähnlichen Seitenketten definiert worden. Diese Familien umfassen 5 Aminosäuren mit basischen Seitenketten (z.B. Lysin, Arginin, Histidin), sauren Seitenketten (z.B. Asparaginsäure, Glutaminsäure), ungeladenen polaren Seitenketten (z.B. Glycin, Asparagin, Glutamin, Serin, Threonin, Tyrosin, Cystein), unpolaren Seitenketten, (z.B. Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Phenylalanin, Methionin, Tryptophan), beta-verzweigten Seitenketten (z.B. Threonin, Valin, Isoleucin) und aromatischen Seitenketten (z.B. Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, Histidin). Ein vorhergesagter nicht-essentieller Aminosäurerest in einer PSE wird somit vorzugsweise durch einen anderen Aminosäurerest aus der 10 gleichen Seitenkettenfamilie ausgetauscht. Alternativ können bei einer anderen Ausführungsform die Mutationen zufallsgemäß über die gesamte oder einen Teil der PSE-codierenden Sequenz eingebracht werden, z.B. durch Sättigungsmutagenese, und die resultierenden Mutanten können nach der hier beschriebenen 15 20 PSE-Aktivität durchmustert werden, um Mutanten zu identifizieren, die PSE-Aktivität beibehalten. Nach der Mutagenese einer der Sequenzen der SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 kann das codierte Protein rekombinant exprimiert werden, und die Aktivität des Proteins kann z.B. 25 unter Verwendung der hier beschriebenen Tests (siehe Beispielteil) bestimmt werden.

Zusätzlich zu den Nukleinsäuremolekülen, welche die vorstehend beschriebenen PSEs codieren, betrifft ein weiterer Aspekt der 30 Erfindung isolierte Nukleinsäuremoleküle, die "Antisense" dazu sind. Eine "Antisense"-Nukleinsäure umfaßt eine Nukleotidsequenz, die zu einer "Sense"-Nukleinsäure, welche ein Protein codiert, komplementär ist, z.B. komplementär zum codierenden Strang eines doppelsträngigen cDNA-Moleküls oder komplementär zu einer mRNA-Sequenz. Eine Antisense-Nukleinsäure kann folglich über Wasserstoffbrückenbindungen an eine Sense-Nukleinsäure binden. Die Antisense-Nukleinsäure kann zu einem gesamten PSE-codierenden Strang oder nur zu einem Teil davon komplementär sein. Bei einer Ausführungsform ist ein Antisense-Nukleinsäuremolekül "Antisense" 35 40 zu einem "codierenden Bereich" des codierenden Strangs einer Nukleotidsequenz, die eine PSE codiert. Der Begriff "codierender Bereich" betrifft den Bereich der Nukleotidsequenz, der Codons umfaßt, die in Aminosäurereste translatiert werden (z.B. den gesamten codierenden Bereich, der mit dem Stopcodon beginnt und 45 endet, d.h. dem letzten Codon vor dem Stopcodon). Bei einer weiteren Ausführungsform ist das Antisense-Nukleinsäuremolekül "Antisense" zu einem "nicht-codierenden Bereich" des codierenden

Strangs einer Nukleotidsequenz, die PSE codiert. Der Begriff "nicht-codierender Bereich" betrifft 5'- und 3'-Sequenzen, die den codierenden Bereich flankieren und nicht in Aminosäuren translatiert werden (d.h. die man auch als 5'- und 5 3'-untranslatierte Bereiche bezeichnet).

Unter Voraussetzung der hier offenbarten PSE-codierenden Sequenzen des codierenden Stranges (z.B. die in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und 10 SEQ ID NO:11 dargestellten Sequenzen) können erfindungsgemäß Antisense-Nukleinsäuren gemäß den Regeln der Watson-Crick-Basenpaarung gestaltet werden. Das Antisense-Nukleinsäuremolekül kann komplementär zum gesamten codierenden Bereich von PSE-mRNA sein, ist aber stärker bevorzugt ein Oligonukleotid, das nur zu einem Teil des codierenden oder nicht-codierenden Bereichs von PSE-mRNA "Antisense" ist. Das Antisense-Oligonukleotid kann z.B. zu dem Bereich, der die Translationsstartstelle von PSE-mRNA umgibt, komplementär sein. Ein Antisense-Oligonukleotid kann z.B. etwa 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 und mehr Nukleotide . 15 lang sein. Vorteilhaft ist ein Antisense-Oligonukleotid 15 bis 25 Nukleotide lang. Eine erfindungsgemäß Antisense-Nukleinsäure kann unter Verwendung chemischer Synthese und enzymatischer Ligationsreaktionen mittels im Fachgebiet bekannter Verfahren konstruiert werden. Eine Antisense-Nukleinsäure (z.B. ein Antisense-Oligonukleotid) kann z.B. chemisch synthetisiert werden, wobei natürlich vorkommende Nukleotide oder verschiedentlich modifizierte Nukleotide verwendet werden, die so gestaltet sind, daß sie die biologische Stabilität der Moleküle erhöhen oder 20 die physikalische Stabilität des zwischen der Antisense- und der Sense-Nukleinsäure gebildeten Duplexes erhöhen, beispielsweise können Phosphorthioat-Derivate und acridinsubstituierte Nukleotide verwendet werden. Beispiele für modifizierte Nukleotide, die zur Erzeugung der Antisense-Nukleinsäure verwendet werden können, sind u.a. 5-Fluoruracil, 5-Bromuracil, 5-Chlor- 25 uracil, 5-Ioduracil, Hypoxanthin, Xanthin, 4-Acetylcytosin, 5-(Carboxyhydroxymethyl)uracil, 5-Carboxymethylaminomethyl-2-thiouridin, 5-Carboxymethylaminomethyluracil, Dihydouracil, Beta-D-Galactosylqueosin, Inosin, N6-Isopentenyladenin, 1-Methylguanin, 1-Methylinosin, 2,2-Dimethylguanin, 2-Methyladenin, 30 2-Methylguanin, 3-Methylcytosin, 5-Methylcytosin, N6-Adenin, 7-Methylguanin, 5-Methylaminomethyluracil, 5-Methoxyaminomethyl-2-thiouracil, Beta-D-Mannosylqueosin, 5'-Methoxycarboxymethyl-uracil, 5-Methoxyuracil, 2-Methylthio-N6-isopentyladenin, Uracil-5-oxyessigsäure (v), Wybutoxosin, Pseudouracil, Queosin, 35 2-Thiocytosin, 5-Methyl-2-thiouracil, 2-Thiouracil, 4-Thiouracil, 5-Methyluracil, Uracil-5-oxyessigsäuremethylester, Uracil-5-oxyessigsäure (v), 5-Methyl-2-thiouracil, 3-(3-Amino-3-N-2-

- carboxypropyl)uracil, (acp3)_w und 2,6-Diaminopurin. Die Anti-sense-Nukleinsäure kann alternativ biologisch unter Verwendung eines Expressionsvektors hergestellt werden, in den eine Nukleinsäure in Antisense-Richtung subkloniert worden ist
5 (d.h. RNA, die von der eingebrachten Nukleinsäure transkribiert wird, ist zu einer Zielnukleinsäure von Interesse in Antisense-Richtung orientiert, was im nachstehenden Unterabschnitt weiter beschrieben ist).
- 10 Die erfindungsgemäßen Antisense-Nukleinsäuremoleküle werden üblicherweise an eine Zelle verabreicht oder in situ erzeugt, so daß sie mit der zellulären mRNA und/oder der genomischen DNA, die eine PSE codiert, hybridisieren oder daran binden, um dadurch die Expression des Proteins, z.B. durch Hemmung der
15 Transkription und/oder Translation, zu hemmen. Die Hybridisierung kann durch herkömmliche Nukleotidkomplementarität unter Bildung eines stabilen Duplexes oder z.B. im Fall eines Antisense-Nukleinsäuremoleküls, das DNA-Duplicates bindet, durch spezifische Wechselwirkungen in der großen Furche der Doppelhelix erfolgen.
20 Das Antisense-Molekül kann so modifiziert sein, daß es spezifisch an einen Rezeptor oder an ein auf einer ausgewählten Zelloberfläche exprimiertes Antigen bindet, z.B. durch Binden des Antisense-Nukleinsäuremoleküls an ein Peptid oder einen Antikörper, das/der an einen Zelloberflächenrezeptor oder ein Antigen bindet.
25 Das Antisense-Nukleinsäuremolekül kann auch unter Verwendung der hier beschriebenen Vektoren den Zellen zugeführt werden. Zur Erzielung ausreichender intrazellulärer Konzentrationen der Antisense-Moleküle sind Vektorkonstrukte, in denen sich das Antisense-Nukleinsäuremolekül unter der Kontrolle eines starken
30 prokaryotischen, viralen oder eukaryotischen, einschließlich pflanzlichen, Promoters befindet, bevorzugt.

Bei einer weiteren Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäuremolekül ein α -anomeres Nukleinsäuremolekül.
35 Ein α -anomeres Nukleinsäuremolekül bildet spezifische doppelsträngige Hybride mit komplementärer RNA, wobei die Stränge im Gegensatz zu gewöhnlichen β -Einheiten parallel zueinander verlaufen. [Gaultier et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15:6625-6641]. Das Antisense-Nukleinsäuremolekül kann zudem ein 2'-O-Methylribo-
40 nukleotid [Inoue et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15:6131-6148] oder ein chimäres RNA-DNA-Analogon [Inoue et al. (1987) FEBS Lett. 215:327-330] umfassen.

Bei einer weiteren Ausführungsform ist eine erfindungsgemäße
45 Antisense-Nukleinsäure ein Ribozym. Ribozyme sind katalytische RNA-Moleküle mit Ribonukleaseaktivität, die eine einzelsträngige Nukleinsäure, wie eine mRNA, spalten können, zu der sie einen

komplementären Bereich haben. Somit können Ribozyme z.B. Hammerhead-Ribozyme [beschrieben in Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591] zur katalytischen Spaltung von PSE-mRNA-Transkripten verwendet werden, um dadurch die Translation von PSE-mRNA zu hemmen. Ein Ribozym mit Spezifität für eine PSE-codierende Nukleinsäure kann auf der Basis der Nukleotidsequenz einer hier offenbarten PSE-cDNA (d.h. 38_ck21_g07fwd in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11) oder auf der Basis einer gemäß den in dieser Erfindung gelehrteten Verfahren zu isolierenden heterologen Sequenz gestaltet werden. Beispielsweise kann ein Derivat einer Tetrahymena-L-19-IVS-RNA konstruiert werden, wobei die Nukleotidsequenz der aktiven Stelle komplementär zu der Nukleotidsequenz ist, die in einer PSE-codierenden mRNA gespalten werden soll. Siehe z.B. Cech et al., US 4,987,071 und Cech et al., US 5,116,742. Alternativ kann PSE-mRNA zur Selektion einer katalytischen RNA mit einer spezifischen Ribonukleaseaktivität aus einem Pool von RNA-Molekülen verwendet werden [siehe z.B. Bartel, D., und Szostak, J.W. (1993) Science 261:1411-1418].

Alternativ lässt sich die PSE-Gen-Expression hemmen, indem Nukleotidsequenzen, die komplementär zum regulatorischen Bereich einer PSE-Nukleotidsequenz (z.B. einem PSE-Promotor und/oder -Enhancer) sind, so dirigiert werden, daß Dreifachhelix-Strukturen gebildet werden, welche die Transkription eines PSE-Gens in Zielzellen hemmen [siehe allgemein Helene, C. (1991) Anticancer Drug Res. 6(6) 569-84; Helene, C., et al. (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci. 660:27-36; und Maher. L.J. (1992) Bioassays 14(12):807-815].

30 B. Genkonstrukt

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist ein neues Genkonstrukt, was eine isolierte Nukleinsäure enthält, die von Physcomitrella, Phytophthora, Cryptocodium oder Thraustochytrium stammt und ein Polypeptid codiert, das C₁₆, C₁₈- oder C₂₀-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängert, oder die Gensequenz der SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11, ihre Homologen, Derivate oder Analoga, die funktionsfähig mit einem oder mehreren Regulationssignalen, vorteilhafterweise zur Steigerung der Genexpression, verbunden sind, enthält. Beispiele für diese Regulationssequenzen sind Sequenzen, an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und, wenn geeignet, genetisch

modifiziert worden sein, so daß die natürliche Regulation ausgeschaltet worden ist und die Expression der Gene gesteigert worden ist. Das Genkonstrukt kann jedoch auch eine einfachere Struktur haben, d.h. daß keine zusätzlichen Regulationssignale vor der

5 Sequenz SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 oder ihren Homologen inseriert worden sind und der natürliche Promotor mit seiner Regulation nicht deletiert worden ist. Statt dessen ist die natürliche Regulationssequenz so mutiert worden, daß keine Regulation mehr

10 stattfindet und die Genexpression verstärkt ist. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise eine oder mehrere sogenannte Enhancer-Sequenzen, die funktionsfähig mit dem Promotor verbunden sind und die gesteigerte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen, umfassen. Es ist auch möglich, am 3'-Ende der DNA-

15 Sequenzen zusätzlich vorteilhafte Sequenzen zu inserieren, beispielsweise weitere Regulationselemente oder Terminatoren. Die Elongasegene können im Genkonstrukt in einer oder mehreren Kopien vorliegen. Es ist vorteilhaft für die Insertion weiterer Gene in Organismen, wenn weitere Gene im Genkonstrukt vorliegen.

20 Vorteilhafte Regulationssequenzen für das neue Verfahren liegen beispielsweise in Promotoren vor, wie dem cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacI^q-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, λ-P_R- oder λ-P_L-Promotor und werden vorteilhafterweise

25 in Gram-negativen Bakterien angewendet. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen liegen beispielsweise in den Gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MFA, AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH oder in den Pflanzen-promotoren CaMV/35S [Franck et al., Cell 21 (1980) 285-294], PRP1

30 [Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993)], SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor vor. In diesem Zusammenhang vorteilhaft sind ebenfalls induzierbare Promotoren, wie die in EP-A-0 388 186 (Benzylsulfonamid-induzierbar), Plant J. 2, 1992:397-404 (Gatz et al., Tetracyclin-35 induzierbar), EP-A-0 335 528 (Abzisinsäure-induzierbar) oder WO 93/21334 (Ethanol- oder Cyclohexenol-induzierbar) beschriebenen Promotoren. Weitere geeignete Pflanzenpromotoren sind der Promotor von cytosolischer FBPase oder der ST-LSI-Promotor der Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8, 1989, 2445), der

40 Phosphoribosylpyrophosphatamidotransferase-Promotor aus Glycine max (Genbank-Zugangsnr. U87999) oder der in EP-A-0 249 676 beschriebene nodienspezifische Promotor. Besonders vorteilhafte Promotoren sind Promotoren, welche die Expression in Geweben ermöglichen, die an der Fettsäurebiosynthese beteiligt sind. Ganz

45 besonders vorteilhaft sind samenspezifische Promotoren, wie der usp-, LEB4-, Phaseolin- oder Napin-Promotor. Weitere besonders vorteilhafte Promotoren sind samenspezifische Promotoren, die für

monokotyle oder dikotyle Pflanzen verwendet werden können und in US 5,608,152 (Napin-Promotor aus Raps), WO 98/45461 (Phaseolin-Promotor aus Arobidopsis), US 5,504,200 (Phaseolin-Promotor aus Phaseolus vulgaris), WO 91/13980 (Bce4-Promotor aus Brassica), 5 von Baeumlein et al., Plant J., 2, 2, 1992:233-239 (LEB4-Promotor aus einer Leguminose) beschrieben sind, wobei sich diese Promotoren für Dikotyledonen eignen. Die folgenden Promotoren eignen sich beispielsweise für Monokotyledonen lpt-2- oder lpt-1-Promotor aus Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230), Hordein-10 Promotor aus Gerste und andere, in WO 99/16890 beschriebene geeignete Promotoren.

Es ist im Prinzip möglich, alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen, wie die oben genannten, für das neue Verfahren zu verwenden. Es ist ebenfalls möglich und vorteilhaft, 15 zusätzlich synthetische Promotoren zu verwenden.

Das Genkonstrukt kann, wie oben beschrieben, auch weitere Gene umfassen, die in die Organismen eingebracht werden sollen. Es ist 20 möglich und vorteilhaft, in die Wirtsorganismen Regulationsgene, wie Gene für Induktoren, Repressoren oder Enzyme, welche durch ihre Enzymaktivität in die Regulation eines oder mehrerer Gene eines Biosynthesewegs eingreifen, einzubringen und darin zu exprimieren. Diese Gene können heterologen oder homologen Ursprungs sein. Die inserierten Gene können ihren eigenen 25 Promotor haben oder auch unter der Kontrolle des Promotors der Sequenz SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 oder seiner Homologen, Derivate oder Analoga stehen.

30 Das Genkonstrukt umfaßt vorteilhafterweise zur Expression der anderen vorliegenden Gene weitere 3'- und/oder 5'-terminale Regulationssequenzen zur Steigerung der Expression, die in Abhängigkeit vom gewählten Wirtsorganismus und dem Gen oder 35 den Genen für die optimale Expression ausgewählt werden.

Diese Regulationssequenzen sollen, wie oben erwähnt, die spezifische Expression der Gene und die Proteinexpression ermöglichen. Dies kann je nach dem Wirtsorganismus beispielsweise bedeuten, daß das Gen nur nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird oder daß es sofort exprimiert und/oder 40 überexprimiert wird.

Die Regulationssequenzen oder -faktoren können außerdem vorzugsweise eine vorteilhafte Wirkung auf die Expression der eingebrachten Gene haben und diese somit steigern. Auf diese Weise ist 45 es möglich, daß die Regulationselemente unter Verwendung starker

Transkriptionssignale, wie Promotoren und/oder Enhancer, vorteilhafterweise auf Transkriptionsebene verstrkert werden. Es ist jedoch weiterhin auch möglich, die Translation zum Beispiel durch Verbesserung der mRNA-Stabilität zu verstärken.

- 5 Vorteilhafterweise werden die erfindungsgemsen Nukleinsäuresequenzen zusammen mit mindestens einem Reportergen in ein Genkonstrukt (= Expressionskassette, Nukleinsäurekonstrukt) kloniert, die in den Organismus über einen Vektor oder direkt in das Genom eingebracht wird. Dieses Reportergen sollte eine
10 leichte Detektierbarkeit über einen Wachstums-, Fluoreszenz-, Chemo-, Biolumineszenz- oder Resistenzassay oder über eine photometrische Messung ermöglichen. Beispielhaft seien als Reportergene Antibiotika- oder Herbizidresistenzgene, Hydrolasegene, Fluoreszenzproteingene, Biolumineszenzgene, Zucker- oder
15 Nukleotidstoffwechselgene oder Biosynthesegene wie das Ura3-Gen, das Ilv2-Gen, das Luciferasegen, das b-Galactosidasegen, das gfp-Gen, das 2-Desoxyglucose-6-phosphat-Phosphatasegen, das b-Glucuronidase-Gen, b-Lactamasegen, das Neomycinphosphotransferasegen, das Hygromycinphosphotransferasegen oder das
20 BASTA (= Gluphosinatresistenz)-Gen genannt. Diese Gene ermöglichen eine leichte Messbarkeit und Quantifizierbarkeit der Transcriptionsaktivitt und damit der Expression der Gene. Damit lassen sich Genomstellen identifizieren, die eine unterschiedliche Produktivität zeigen.
25 Die erfindungsgemsen Nukleinsäuresequenzen mit SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11, die für Elongasen codieren können in einer oder mehreren Kopien in der Expressionskassette (= Genkonstrukt)
30 enthalten sein.

In der Expressionskassette (= Genkonstrukt, Nukleinsäurekonstrukt) kann noch mindestens eine weitere Nukleinsäure, die für ein Gen bevorzugt aus der Fettsäurebiosynthese codiert,
35 enthalten sein, die in die Wirtsorganismen eingebracht werden sollen. Diese Gene können unter getrennter Regulation oder unter der gleichen Regulationsregion wie die Gene erfindungsgemsen Elongase liegen. Bei diesen Genen handelt es sich beispielsweise um weitere Biosynthesegene vorteilhaft der Fettsäurebiosynthese,
40 die eine gesteigerte Synthese ermöglichen. Beispielsweise seien die Gene für die Δ 19-, Δ 17-, Δ 15-, Δ 12-, Δ 9-, Δ 8-, Δ 6-, Δ 5-, Δ 4-Desaturase, die verschiedenen Hydroxylasen, die Δ 12-Acetylenase, die Acyl-ACP-Thioesterasen, β -Ketoacyl-ACP-Synthasen oder β -Ketoacyl-ACP-Reductasen genannt. Vorteilhaft
45 werden die Desaturasegene im Nukleinsäurekonstrukt verwendet.

Auch diese Gene können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

C. Rekombinante Expressionsvektoren und Wirtszellen

5

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Vektoren, vorzugsweise Expressionsvektoren, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Genkonstrukt enthalten, die eine PSE (oder einen Teil davon) codieren. Wie hier verwendet, betrifft 10 der Begriff "Vektor" ein Nukleinsäuremolekül, das eine andere Nukleinsäure transportieren kann, an welche es gebunden ist. Ein Vektortyp ist ein "Plasmid", was für eine zirkuläre doppelsträngige DNA-Schleife steht, in die zusätzlichen DNA-Segmente ligiert werden können. Ein weiterer Vektortyp ist ein viraler 15 Vektor, wobei zusätzliche DNA-Segmente in das virale Genom ligiert werden können. Bestimmte Vektoren können in einer Wirtszelle, in die sie eingebracht worden sind, autonom replizieren (z.B. Bakterienvektoren mit bakteriellem Replikationsursprung und episomale Säugervektoren). Andere Vektoren (z.B. nicht-episomale 20 Säugervektoren) werden beim Einbringen in die Wirtszelle in das Genom einer Wirtszelle integriert und dadurch zusammen mit dem Wirtsgenom repliziert. Zudem können bestimmte Vektoren die Expression von Genen, mit denen sie funktionsfähig verbunden sind, steuern. Diese Vektoren werden hier als "Expressions- 25 vektoren" bezeichnet. Gewöhnlich haben Expressionsvektoren, die für DNA-Rekombinationstechniken geeignet sind, die Form von Plasmiden. In der vorliegenden Beschreibung können "Plasmid" und "Vektor" austauschbar verwendet werden, da das Plasmid die am häufigsten verwendete Vektorform ist. Die Erfindung soll jedoch 30 diese anderen Expressionsvektorformen, wie virale Vektoren (z.B. replikationsdefiziente Retroviren, Adenoviren und adenoverwandte Viren), die ähnliche Funktionen ausüben, umfassen. Ferner soll der Begriff Vektor auch andere Vektoren, die dem Fachmann bekannt sind, wie Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus, Adenovirus, 35 Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Phagemide, Cosmide, lineare oder zirkuläre DNA sowie RNA umfassen.

Die erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionsvektoren umfassen eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Genkonstrukt in einer Form, die sich zur Expression der Nukleinsäure in einer Wirtszelle eignet, was bedeutet, daß die rekombinanten Expressionsvektoren eine oder mehrere Regulationssequenzen, ausgewählt auf der Basis der zur Expression zu verwendenden Wirtszellen, die mit der zu exprimierenden Nuklein- 45 säuresequenz funktionsfähig verbunden ist, umfaßt. In einem rekombinanten Expressionsvektor bedeutet "funktionsfähig verbunden", daß die Nukleotidsequenz von Interesse derart an die

Regulationssequenz(en) gebunden ist, daß die Expression der Nukleotidsequenz möglich ist und sie aneinander gebunden sind, so daß beide Sequenzen die vorhergesagte, der Sequenz zugeschriebene Funktion erfüllen (z.B. in einem In-vitro-Transkriptions-/Trans-
5 lationssystem oder in einer Wirtszelle, wenn der Vektor in die Wirtszelle eingebracht wird). Der Begriff "Regulationssequenz" soll Promotoren, Enhancer und andere Expressionskontrollelemente (z.B. Polyadenylierungssignale) umfassen. Diese Regulations-sequenzen sind z.B. beschrieben in Goeddel: Gene Expression
10 Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990), oder siehe: Gruber und Crosby, in: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Florida, Hrsgb.: Glick und Thompson, Kapitel 7, 89-108, ein-schließlich der Literaturstellen darin. Regulationssequenzen
15 umfassen solche, welche die konstitutive Expression einer Nukleotidsequenz in vielen Wirtszelltypen steuern, und solche, welche die direkte Expression der Nukleotidsequenz nur in bestimmten Wirtszellen unter bestimmten Bedingungen steuern.
Der Fachmann weiß, daß die Gestaltung des Expressionsvektors von
20 Faktoren, wie der Auswahl der zu transformierenden Wirtszelle, dem Ausmaß der Expression des gewünschten Proteins usw., abhängen kann. Die erfindungsgemäßen Expressionsvektoren können in Wirts-zellen eingebracht werden, um dadurch Proteine oder Peptide, einschließlich Fusionsproteinen oder -peptiden, herzustellen,
25 die von den Nukleinsäuren, wie hier beschrieben, codiert werden (z.B. PSEs, mutante Formen von PSEs, Fusionsproteine usw.).

Die erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionsvektoren können zur Expression von PSEs in prokaryotischen oder eukaryotischen
30 Zellen gestaltet sein. Beispielsweise können PSE-Gene in bakteriellen Zellen, wie *C. glutamicum*, Insektenzellen (unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren), Hefe- und anderen Pilzzellen [siehe Romanos, M.A., et al. (1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", Yeast 8:423-488; van den
35 Hondel, C.A.M.J.J., et al. (1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi", in: More Gene Manipulations in Fungi, J.W. Bennet & L.L. Lasure, Hrsgb., S. 396-428: Academic Press: San Diego; und van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P.J. (1991)
"Gene transfer systems and vector development for filamentous
40 fungi, in: Applied Molecular Genetics of Fungi, Peberdy, J.F., et al., Hrsgb., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge], Algen [Falciatore et al., 1999, Marine Biotechnology. 1, 3:239-251)], Ciliaten der Typen: wie Holotrichia, Peritrichia, Spirotrichia, Suctoria, Tetrahymena, Paramecium, Colpidium,
45 Glaucoma, Platyophrya, Potomacus, Pseudocohnilembus, Euplotes, Engelmaniella und Styloynchia, insbesondere der Gattung Styloynchia lemnae, mit Vektoren nach einem Transformations-

verfahren, wie beschrieben in WO 98/01572, sowie Zellen viel-zelliger Pflanzen [siehe Schmidt, R. und Willmitzer, L. (1988) "High efficiency Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* leaf and cotyledon explants" 5 Plant Cell Rep.:583-586; Plant Molecular Biology and Biotechnology, C Press, Boca Raton, Florida, Kapitel 6/7, S.71-119 (1993); F.F. White, B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-43; Potrykus, Annu. 10 Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225 (und darin zitierte Literaturstellen)] oder Säugerzellen exprimiert werden. Geeignete Wirtszellen werden ferner erörtert in Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Der rekombinante Expressionsvektor 15 kann alternativ, zum Beispiel unter Verwendung von T7-Promotor-Regulationssequenzen und T7-Polymerase, in vitro transkribiert und translatiert werden.

Die Expression von Proteinen in Prokaryoten erfolgt meist 20 mit Vektoren, die konstitutive oder induzierbare Promotoren enthalten, welche die Expression von Fusions- oder nicht-Fusionsproteinen steuern. Fusionsvektoren fügen eine Reihe von Aminosäuren an ein darin codiertes Protein an, gewöhnlich am Aminoterminus des rekombinanten Proteins, aber auch am C-Terminus 25 oder fusioniert innerhalb geeigneter Bereiche in den Proteinen. Diese Fusionsvektoren haben gewöhnlich drei Aufgaben: 1) die Verstärkung der Expression von rekombinantem Protein; 2) die Erhöhung der Löslichkeit des rekombinanten Proteins und 3) die Unterstützung der Reinigung des rekombinanten Proteins durch 30 Wirkung als Ligand bei der Affinitätsreinigung beispielsweise über sogenannte His-Tags. Bei Fusions-Expressionsvektoren wird oft eine proteolytische Spaltstelle an der Verbindungsstelle der Fusionseinheit und des rekombinanten Proteins eingebracht, so daß die Abtrennung des rekombinanten Proteins von der Fusionseinheit 35 nach der Reinigung des Fusionsproteins möglich ist. Diese Enzyme und ihre entsprechenden Erkennungssequenzen umfassen Faktor Xa, Thrombin und Enterokinase.

Typische Fusions-Expressionsvektoren sind u.a. pGEX [Pharmacia 40 Biotech Inc; Smith, D.B., und Johnson, K.S. (1988) Gene 67:31-40], pMAL [New England Biolabs, Beverly, MA] und pRIT5 [Pharmacia, Piscataway, NJ], bei denen Glutathion-S-Transferase (GST), Maltose E-bindendes Protein bzw. Protein A an das rekombinante Zielprotein fusioniert wird. Bei einer Ausführungs-45 form ist die PSE-codierende Sequenz in einen pGEX-Expressionsvektor kloniert, so daß ein Vektor erzeugt wird, der ein Fusionsprotein codiert, das vom N-Terminus zum C-Terminus GST-Thrombin-

Spaltstelle-X-Protein umfaßt. Das Fusionsprotein kann durch Affinitätschromatographie unter Verwendung von Glutathion-Agarose-Harz gereinigt werden. Rekombinante PSE, die nicht an GST fusioniert ist, kann durch Spaltung des Fusionsproteins 5 mit Thrombin gewonnen werden.

- Beispiele für geeignete induzierbare nicht-Fusions-E. coli-Expressionsvektoren sind u.a. pTrc (Amann et al. (1988) Gene 69:301-315) und pET 11d (Studier et al., Gene Expression 10 Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60-89). Die Zielgenexpression vom pTrc-Vektor beruht auf der Transkription durch Wirts-RNA-Polymerase von einem Hybrid-trp-lac-Fusionspromotor. Die Zielgenexpression aus dem pET 11d-Vektor beruht auf der Transkription von einem T7-gn10-lac-15 Fusions-Promotor, die von einer coexprimierten viralen RNA-Polymerase (T7 gn1) vermittelt wird. Diese virale Polymerase wird von den Wirtsstämmen BL21 (DE3) oder HMS174 (DE3) von einem residenten λ -Prophagen bereitgestellt, der ein T7 gn1-Gen unter der Transkriptionskontrolle des lacUV 5-Promotors birgt.
- 20 Andere in prokaryotischen Organismen geeignete Vektoren sind dem Fachmann bekannt, diese Vektoren sind beispielsweise in E. coli pLG338, pACYC184, die pBR-Reihe, wie pBR322, die pUC-Reihe, wie pUC18 oder pUC19, die M113mp-Reihe, pKC30, pRep4, pHs1, pHs2, 25 pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III¹¹³-B1, pgt11 or pBdCI, in Streptomyces pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in Bacillus pUB110, pC194 oder pBD214, in Corynebacterium pSA77 oder pAJ667.
- 30 Eine Strategie zur Maximierung der Expression von rekombinantem Protein ist die Expression des Proteins in einem Wirtsbakterium, dessen Fähigkeit zur proteolytischen Spaltung des rekombinanten Proteins gestört ist [Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 119-128]. Eine weitere Strategie ist die Veränderung der 35 Nukleinsäuresequenz der in einen Expressionsvektor zu inserierenden Nukleinsäure, so daß die einzelnen Codons für jede Aminosäure diejenigen sind, die vorzugsweise in einem zur Expression ausgewählten Bakterium, wie *C. glutamicum*, verwendet werden [Wada et al. (1992) Nucleic Acids Res. 20:2111-2118]. Diese 40 Veränderung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen erfolgt durch Standard-DNA-Synthesetechniken.

Bei einer weiteren Ausführungsform ist der PSE-Expressionsvektor ein Hefe-Expressionsvektor. Beispiele für Vektoren zur Expression 45 in der Hefe *S. cerevisiae* umfassen pYEpSec1 [Baldari et al. (1987) Embo J. 6:229-234], pMFA [Kurjan und Herskowitz (1982) Cell 30:933-943], pJRY88 [Schultz et al. (1987) Gene 54:113-123]

sowie pYES2 [Invitrogen Corporation, San Diego, CA]. Vektoren und Verfahren zur Konstruktion von Vektoren, die sich zur Verwendung in anderen Pilzen, wie den filamentösen Pilzen, eignen, umfassen diejenigen, die eingehend beschrieben sind in: van den Hondel,
5 C.A.M.J.J., & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics of fungi, J.F. Peberdy et al., Hrsgb., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge, oder in: More Gene Manipulations in Fungi [J.W. Bennet & L.L. Lasure, Hrsgb., S. 396-428: Academic
10 Press: San Diego]. Weitere geeignete Hefevektoren sind beispielsweise pAG-1, YEp6, YEp13 oder pEMBLYe23.

Alternativ können die erfindungsgemäßen PSEs in Insektenzellen unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren exprimiert
15 werden. Baculovirus-Vektoren, die zur Expression von Proteinen in gezüchteten Insektenzellen (z.B. Sf9-Zellen) verfügbar sind, umfassen die pAc-Reihe [Smith et al. (1983) Mol. Cell Biol.. 3:2156-2165] und die pVL-Reihe [Lucklow und Summers (1989) Virology 170:31-39].
20

Die oben genannten Vektoren bieten nur einen kleinen Überblick über mögliche geeignete Vektoren. Weitere Plasmide sind dem Fachmann bekannt und sind zum Beispiel beschrieben in: Cloning Vectors (Hrsgb. Pouwels, P.H., et al., Elsevier, Amsterdam-
25 New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018).

Bei noch einer weiteren Ausführungsform wird eine erfindungsgemäße Nukleinsäure in Säugerzellen unter Verwendung eines Säger-Expressionsvektors exprimiert. Beispiele für Säger-
30 Expressionsvektoren umfassen pCDM8 [Seed, B. (1987) Nature 329:840] und pMT2PC [Kaufman et al. (1987) EMBO J. 6:187-195]. Bei der Verwendung in Säugerzellen werden die Kontrollfunktionen des Expressionsvektors oft von viralen Regulationselementen bereitgestellt. Üblicherweise verwendete Promotoren stammen z.B.
35 aus Polyoma, Adenovirus2, Cytomegalievirus und Simian Virus 40. Weitere geeignete Expressionssysteme für prokaryotische und eukaryotische Zellen siehe in den Kapiteln 16 und 17 von Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory,
40 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Bei einer anderen Ausführungsform kann der rekombinante Säger-Expressionsvektor die Expression der Nukleinsäure vorzugsweise in
45 einem bestimmten Zelltyp steuern (z.B. werden gewebespezifische Regulationselemente zur Expression der Nukleinsäure verwendet). Gewebespezifische Regulationselemente sind im Fachgebiet bekannt.

Nicht beschränkende Beispiele für geeignete gewebespezifische Promotoren sind u.a. der Albuminpromotor [leberspezifisch; Pinkert et al. (1987) Genes Dev. 1:268-277], lymphoidspezifische Promotoren [Calame und Eaton (1988) Adv. Immunol. 43:235-275],
5 insbesondere Promotoren von T-Zellrezeptoren [Winoto und Baltimore (1989) EMBO J. 8:729-733] und Immunglobulinen [Banerji et al. (1983) Cell 33:729-740; Queen und Baltimore (1983) Cell 33:741-748], neuronspezifische Promotoren [z.B. Neurofilament-Promotor; Byrne und Ruddle (1989) PNAS 86:5473-5477], pankreas-
10 spezifische Promotoren [Edlund et al., (1985) Science 230:912-916] und milchdrüsenspezifische Promotoren [z.B. Milch-serum-Promotor; US 4,873,316 und EP-A-0 264 166]. Auch ent-wicklungsregulierte Promotoren sind umfaßt, z.B. die hox-Promotoren der Maus [Kessel und Gruss (1990) Science 249:374-379]
15 und der Fetoprotein-Promotor [Campes und Tilghman (1989) Genes Dev. 3:537-546].

Bei einer weiteren Ausführungsform können die erfindungsgemäß PSEs in einzelligen Pflanzenzellen (wie Algen), siehe Falciatore et al., 1999, Marine Biotechnology 1 (3):239-251 und darin zitierte Literaturangaben, und Pflanzenzellen aus höheren Pflanzen (z.B. Spermatophyten, wie Feldfrüchten) exprimiert werden. Beispiele für Pflanzen-Expressionsvektoren umfassen solche, die eingehend beschrieben sind in: Becker, D., Kemper, E.,
25 Schell, J., und Masterson, R. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", Plant Mol. Biol. 20:1195-1197; und Bevan, M.W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", Nucl. Acids Res. 12:8711-8721; Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in:
30 Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsg.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38. Weitere geeignete pflanzliche Vektoren werden unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71-119 beschrieben. Vorteilhafte Vektoren sind sog. shuttle-
35 Vektoren oder binäre Vektoren, die in *E. coli* und Agrobacterium replizieren.

Eine Pflanzen-Expressionskassette enthält vorzugsweise Regulationssequenzen, welche die Genexpression in Pflanzen-
40 zellen steuern können und funktionsfähig verbunden sind, so daß jede Sequenz ihre Funktion, wie Termination der Transkription, erfüllen kann, beispielsweise Polyadenylierungssignale. Bevor-zugte Polyadenylierungssignale sind diejenigen, die aus Agro-bacterium tumefaciens-t-DNA stammen, wie das als Octopinsynthase
45 bekannte Gen 3 des Ti-Plasmids pTiACH5 [Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835ff.] oder funktionelle Äquivalente davon, aber auch

alle anderen in Pflanzen funktionell aktiven Terminatoren sind geeignet.

Da die Pflanzengenexpression sehr oft nicht auf Transkriptions-
5 ebenen beschränkt ist, enthält eine Pflanzen-Expressionskassette vorzugsweise andere funktionsfähig verbunden Sequenzen, wie Translationsenhancer, beispielsweise die Overdrive-Sequenz, welche die 5'-untranslatierte Leader-Sequenz aus Tabakmosaikvirus, die das Protein/RNA-Verhältnis erhöht, enthält [Gallie
10 et al., 1987, Nucl. Acids Research 15:8693-8711].

Die Pflanzengenexpression muss funktionsfähig mit einem geeigneten Promotor verbunden sein, der die Genexpression auf rechtzeitige, zell- oder gewebespezifische Weise durchführt.
15 Bevorzugt sind Promotoren, welche die konstitutive Expression herbeiführen [Benfey et al., EMBO J. 8 (1989) 2195-2202], wie diejenigen, die von Pflanzenviren stammen, wie 35S CAMV [Franck et al., Cell 21 (1980) 285-294], 19S CaMV (siehe auch US 5,352,605 und WO 84/02913) oder Pflanzenpromotoren, wie der in
20 US 4,962,028 beschriebene der kleinen Untereinheit der Rubisco.

Andere bevorzugte Sequenzen für die Verwendung zur funktions-fähigen Verbindung in Pflanzengenexpressions-Kassetten sind Targeting-Sequenzen, die zur Steuerung des Genproduktes in sein
25 entsprechendes Zellkompartiment notwendig sind [siehe eine Übersicht in Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285-423 und darin zitierte Literaturstellen], beispielsweise in die Vakuole, den Zellkern, alle Arten von Plastiden, wie Amyloplasten, Chloroplasten, Chromoplasten, den extrazellulären Raum, die Mitochondrien, das Endoplasmatische Retikulum, Ölkörper, Peroxisomen und andere Kompartimente von Pflanzenzellen.

Die Pflanzengenexpression lässt sich auch über einen chemisch induzierbaren Promotor erleichtern [siehe eine Übersicht in Gatz
35 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48:89-108]. Chemisch induzierbare Promotoren eignen sich besonders, wenn gewünscht wird, daß die Genexpression auf zeitspezifische Weise erfolgt. Beispiele für solche Promotoren sind ein Salicylsäure-induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein Tetracyclin-induzierbarer Promotor [Gatz et al. (1992) Plant J. 2, 397-404] und ein Ethanol-induzierbarer Promotor.

Auch Promotoren, die auf biotische oder abiotische Stresbedingungen reagieren, sind geeignete Promotoren, beispielsweise
45 der pathogeninduzierte PRP1-Gen-Promotor [Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993) 361-366], der hitzeinduzierbare hsp80-Promotor aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare Alpha-

amylase-Promotor aus Kartoffel (WO 96/12814) oder der durch Wunden induzierbare pinII-Promotor (EP-A-0 375 091).

Es sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, welche die Genexpression in Geweben und Organen herbeiführen, in denen die Lipid- und Ölbiosynthese stattfindet, in Samenzellen, wie den Zellen des Endosperms und des sich entwickelnden Embryos. Geeignete Promotoren sind der Napingen-Promotor aus Raps (US 5,608,152), der USP-Promotor aus Vicia faba [Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3):459-67], der Oleosin-Promotor aus Arabidopsis (WO 98/45461), der Phaseolin-Promotor aus Phaseolus vulgaris (US 5,504,200), der Bce4-Promotor aus Brassica (WO 91/13980) oder der Legumin-B4-Promotor [LeB4; Baeumlein et al., 1992, Plant Journal, 2 (2):233-9] sowie Promotoren, welche die samenspezifische Expression in Monokotyledonen-Pflanzen, wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis usw. herbeiführen. Geeignete beachtenswerte Promotoren sind der lpt2- oder lpt1-Gen-Promotor aus Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230) oder die in WO 99/16890 beschriebenen (Promotoren aus dem Gersten-Hordein-Gen, dem Reis-Glutelin-Gen, dem Reis-Oryzin-Gen, dem Reis-Prolamín-Gen, dem Weizen-Gliadin-Gen, Weizen-Glutelin-Gen, dem Mais-Zein-Gen, dem Hafer-Glutelin-Gen, dem Sorghum-Kasirin-Gen, dem Roggen-Secalin-Gen).

Ebenfalls besonders geeignet sind Promotoren, welche die plastidenspezifische Expression herbeiführen, da Plastiden das Kompartiment sind, in dem die Vorläufer sowie einige Endprodukte der Lipidbiosynthese synthetisiert werden. Geeignete Promotoren, wie der virale RNA-Polymerase-Promotor, sind beschrieben in WO 95/16783 und WO 97/06250, und der clpp-Promotor aus Arabidopsis, beschrieben in WO 99/46394.

Die Erfindung stellt zudem einen rekombinanten Expressionsvektor bereit, umfassend ein erfindungsgemäßes DNA Molekül, das in Antisense-Richtung in den Expressionsvektor kloniert ist. d.h. das DNA-Molekül ist derart mit einer regulatorischen Sequenz funktionsfähig verbunden, daß die Expression (durch Transkription des DNA-Moleküls) eines RNA-Moleküls, das zur mRNA "Antisense" ist, ermöglicht wird. Es können Regulationssequenzen ausgewählt werden, die funktionsfähig mit einer in Antisense-Richtung klonierten Nukleinsäure verbunden sind und die kontinuierliche Expression des Antisense-RNA-Moleküls in einer Vielzahl von Zelltypen steuern, zum Beispiel können virale Promotoren und/oder Enhancer oder Regulationssequenzen ausgewählt werden, welche die konstitutive, gewebespezifische oder zelltypspezifische Expression von Antisense-RNA steuern. Der Antisense-Expressionsvektor kann in Form eines rekombinanten Plasmids,

Phagemids oder attenuierten Virus vorliegen, in dem Antisense-Nukleinsäuren unter der Kontrolle eines hochwirksamen regulatorischen Bereichs produziert werden, dessen Aktivität durch den Zelltyp bestimmt werden kann, in den der Vektor eingebracht worden ist. Eine Erläuterung der Regulation der Genexpression mittels Antisense-Genen siehe in Weintraub, H., et al., Antisense-RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews - Trends in Genetics, Bd. 1(1) 1986.

10 Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Wirtszellen, in die ein erfindungsgemäßer rekombinanter Expressionsvektor eingebracht worden ist. Die Begriffe "Wirtszelle" und "rekombinante Wirtszelle" werden hier untereinander austauschbar verwendet. Selbstverständlich betreffen diese Begriffe nicht nur die bestimmte
15 Zielzelle, sondern auch die Nachkommen oder potentiellen Nachkommen dieser Zelle. Da in aufeinanderfolgenden Generationen aufgrund von Mutation oder Umwelteinflüssen bestimmte Modifikationen auftreten können, sind diese Nachkommen nicht unbedingt mit der Parentalzelle identisch, sind jedoch immer noch vom Umfang des
20 Begriffs, wie hier verwendet, umfaßt.

Eine Wirtszelle kann eine prokaryotische oder eukaryotische Zelle sein. Zum Beispiel kann eine PSE in Bakterienzellen, wie C. glutamicum, Insektenzellen, Pilzzellen oder Säugerzellen (wie
25 Chinesischer Hamster-Ovarzellen (CHO) oder COS-Zellen), Algen, Ciliaten, Pflanzenzellen, Pilzen oder anderen Mikroorganismen, wie C. glutamicum, exprimiert werden. Andere geeignete Wirtszellen sind dem Fachmann geläufig.

30 Vektor-DNA läßt sich in prokaryotische oder eukaryotische Zellen über herkömmliche Transformations- oder Transfektionstechniken einbringen. Die Begriffe "Transformation" und "Transfektion", Konjugation und Transduktion, wie hier verwendet, sollen eine Vielzahl von im Stand der Technik bekannten Verfahren zum Ein-
35 bringen fremder Nukleinsäure (z.B. DNA) in eine Wirtszelle, einschließlich Calciumphosphat- oder Calciumchlorid-Copräzipitation, DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion, Lipofektion, natürliche Kompetenz, chemisch vermittelter Transfer, Elektroporation oder Teilchenbeschuß, umfassen. Geeignete Verfahren zur Transformation
40 oder Transfektion von Wirtszellen, einschließlich Pflanzenzellen, lassen sich finden in Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual., 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) und anderen Labor-Handbüchern, wie Methods in Molecular
45 Biology, 1995, Bd. 44, Agrobacterium protocols, Hrsgb: Gartland und Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey.

Über die stabile Transfektion von Säugerzellen ist bekannt, daß je nach verwendetem Expressionsvektor und verwendeter Transfektionstechnik nur ein kleiner Teil der Zellen die fremde DNA in ihr Genom integriert. Zur Identifikation und Selektion dieser 5 Integranten wird gewöhnlich ein Gen, das einen selektierbaren Marker (z.B. Resistenz gegen Antibiotika) codiert, zusammen mit dem Gen von Interesse in die Wirtszellen eingebracht. Bevorzugte selektierbare Marker umfassen solche, welche Resistenz gegen Medikamente, wie G418, Hygromycin und Methotrexat, verleihen, 10 oder in Pflanzen solche, welche Resistenz gegen ein Herbizid, wie Glyphosphat oder Glufosinat, verleihen. Weitere geeignete Marker sind beispielsweise Marker, welche Gene codieren, die an Biosynthesewegen von zum Beispiel Zuckern oder Aminosäuren beteiligt sind, wie β -Galactosidase, ura3 oder ilv2. Marker, welche Gene, 15 wie Luziferase, gfp oder andere Fluoreszenzgene codieren, sind ebenfalls geeignet. Diese Marker lassen sich in Mutanten verwenden, in denen diese Gene nicht funktionell sind, da sie beispielsweise mittels herkömmlicher Verfahren deletiert worden sind. Ferner können Marker, welche eine Nukleinsäure codieren, 20 die einen selektierbaren Marker codiert, in eine Wirtszelle auf dem gleichen Vektor eingebracht werden, wie derjenige, der eine PSE codiert, oder können auf einem gesonderten Vektor eingebracht werden. Zellen, die mit der eingebrachten Nukleinsäure stabil transfiziert worden sind, können zum Beispiel durch 25 Medikamentenselektion identifiziert werden (z.B. überleben Zellen, die den selektierbaren Marker integriert haben, wohingegen die anderen Zellen absterben).

Zur Erzeugung eines homolog rekombinierten Mikroorganismus wird 30 ein Vektor hergestellt, der zumindest einen Abschnitt eines PSE-Gens enthält, in den eine Deletion, Addition oder Substitution eingebracht worden ist, um dadurch das PSE-Gen zu verändern, z.B. funktionell zu disruptieren. Dieses PSE-Gen ist vorzugsweise ein Physcomitrella, Phytophthora-, Cryptocodium- oder 35 Thraustochytrium PSE-Gen, es kann jedoch ein Homologon oder Analogon aus anderen Organismen, sogar aus einer Säuger- Pilz- oder Insektenquelle verwendet werden. Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist der Vektor so gestaltet, daß das endogene PSE-Gen bei homologer Rekombination funktionell disruptiert wird 40 (d.h. nicht länger ein funktionelles Protein codiert, auch als Knock-out-Vektor bezeichnet). Alternativ kann der Vektor so gestaltet sein, daß das endogene PSE-Gen bei homologer Rekombination mutiert oder anderweitig verändert wird, aber immer noch ein funktionelles Protein codiert (z.B. kann der stromaufwärts 45 gelegene regulatorische Bereich so verändert sein, daß dadurch die Expression der endogenen PSE verändert wird). Zur Erzeugung einer Punktmutation über homologe Rekombination können auch als

Chimeroplasty bekannte DNA-RNA-Hybide verwendet werden, die aus Cole-Strauss et al., 1999, Nucleic Acids Research 27(5):1323-1330 und Kmiec, Gene therapy, 1999, American Scientist, 87(3):240-247 bekannt sind.

5

Im Vektor für die homologe Rekombination ist der veränderte Abschnitt des PSE-Gens an seinem 5'- und 3'-Ende von zusätzlicher Nukleinsäure des PSE-Gens flankiert, so daß homologe Rekombination zwischen dem exogenen PSE-Gen, das auf dem Vektor vor 10 liegt, und einem endogenen PSE-Gen in einem Mikroorganismus oder einer Pflanze möglich ist. Die zusätzliche flankierende PSE-Nukleinsäure ist für eine erfolgreiche homologe Rekombination mit dem endogenen Gen hinreichend lang. Gewöhnlich sind im Vektor mehrere hundert Basenpaare bis zu Kilobasen flankierende DNA (so- 15 wohl am 5'- als auch am 3'-Ende) enthalten [eine Beschreibung von Vektoren zur homologen Rekombination siehe z.B. in Thomas, K.R., und Capecchi, M.R. (1987) Cell 51:503 oder der Rekombination in Physcomitrella patens auf cDNA-Basis in Strepp et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (8):4368-4373]. Der Vektor wird in 20 einen Mikroorganismus oder eine Pflanzenzelle (z.B. mittels Polyethylenglycol-vermittelter DNA) eingebracht, und Zellen, in denen das eingebrachte PSE-Gen mit dem endogenen PSE-Gen homolog rekombiniert ist, werden unter Verwendung im Fachgebiet bekannter Techniken selektiert.

25

Bei einer anderen Ausführungsform können rekombinante Organismen, wie Mikroorganismen der Pflanzen, hergestellt werden, die ausgewählte Systeme enthalten, welche eine regulierte Expression des eingebrachten Gens ermöglichen. Der Einschluß eines PSE-Gens 30 in einem Vektor, wobei es unter die Kontrolle des lac-Operons gebracht wird, ermöglicht z.B. die Expression des PSE-Gens nur in Gegenwart von IPTG. Diese Regulationssysteme sind im Fachgebiet bekannt.

35 Eine erfindungsgemäße Wirtszelle, wie eine prokaryotische oder eukaryotische Wirtszelle, in Kultur oder auf einem Feld wachsend, kann zur Produktion (d.h. Expression) einer PSE verwendet werden. In Pflanzen kann zusätzlich ein alternatives Verfahren durch direkten Transfer von DNA in sich entwickelnde Blüten über

40 Elektroporation oder Gentransfer mittels Agrobacterium angewendet werden. Die Erfindung stellt folglich ferner Verfahren zur Produktion von PSEs unter Verwendung der erfindungsgemäßen Wirtszellen bereit. Bei einer Ausführungsform umfaßt das Verfahren die Anzucht der erfindungsgemäßen Wirtszelle (in die

45 ein rekombinanter Expressionsvektor, der eine PSE codiert, eingebracht worden ist, oder in deren Genom ein Gen eingebracht worden ist, das eine Wildtyp- oder veränderte PSE codiert) in

54

einem geeigneten Medium, bis die PSE produziert worden ist. Das Verfahren umfaßt bei einer weiteren Ausführungsform das Isolieren der PSEs aus dem Medium oder der Wirtszelle.

- 5 Wirtszellen, die im Prinzip zum Aufnehmen der erfindungsgemäßen Nukleinsäure, des erfindungsgemäßen neuen Genproduktes oder des erfindungsgemäßen Vektors geeignet sind, sind alle prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Die vorteilhafte Weise verwendeten Wirtsorganismen sind Organismen, wie Bakterien,
10 Pilze, Hefen, Tier- oder Pflanzenzellen. Weitere vorteilhafte Organismen sind Tiere oder vorzugsweise Pflanzen oder Teile davon. Unter dem Begriff "Tier" wird hier verstanden, daß Menschen nicht umfaßt sind. Pilze, Hefen oder Pflanzen werden vorzugsweise verwendet, besonders bevorzugt Pilze oder Pflanzen, ganz
15 besonders bevorzugt Pflanzen, wie Ölfruchtpflanzen, die große Mengen an Lipidverbindungen enthalten, wie Raps, Nachtkerze, Rizinus, Canola, Erdnuß, Lein, Soja, Safflor, Sonnenblume, Borretsch, Ölpalme, Kokosnuß oder Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Baumwolle, Maniok,
20 Pfeffer, Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölplame, Kokosnuß) sowie ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte. Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Pflanzen sind Ölfruchtpflanzen, wie Soja,
25 Erdnuß, Raps, Canola, Rizinus, Lein, Nachtkerze, Sonnenblume, Safflor, Bäume (Ölpalme, Kokosnuß).

In einem besonders bevorzugten Aspekt betrifft die Erfindung eine Pflanzenzelle, die das erfindungsgemäße Polynukleotid oder den erfindungsgemäßen Vektor umfaßt. Weiter bevorzugt sind transgene Pflanzen oder Pflanzengewebe, die die erfindungsgemäße Pflanzenzelle umfassen. In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung jene Teile der erfindungsgemäßen Pflanzen, die man ernten kann, und jenes Material, das sich für die Vermehrung der transgenen Pflanzen gemäß der Erfindung eignet und welche entweder erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, die die erfindungsgemäße Nukleinsäure exprimieren, oder Zellen enthalten, die einen erhöhten Level des erfindungsgemäßen Proteins besitzen. Erntefähig sind prinzipiell alle Teile einer Pflanze, insbesondere Blüten,
35 Pollen, Früchte, Sämlinge, Wurzeln, Blätter, Samen, Knollen, Stengel usw.. Vermehrungsmaterial umfaßt z.B. Samen, Früchte, Sämlinge, Knollen, Schnitte und Wurzelstöcke.

D. Isolierte PSE

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft isolierte PSEs und biologisch aktive Teile davon. Ein "isoliertes" oder 5 "gereinigtes" Protein oder ein biologisch aktiver Teil davon ist im wesentlichen frei von zellulärem Material, wenn es durch DNA-Rekombinationstechniken produziert wird, oder von chemischen Vorstufen oder andern Chemikalien, wenn es chemisch synthetisiert wird. Der Begriff "im wesentlichen frei von zellulärem Material" 10 umfaßt PSE-Präparationen, in denen das Protein von zellulären Komponenten der Zellen, in denen es natürlich oder rekombinant produziert wird, getrennt ist. Bei einer Ausführungsform umfaßt der Ausdruck "im wesentlichen frei von zellulärem Material" PSE-Präparationen mit weniger als etwa 30 % (bezogen auf das Trocken- 15 gewicht) nicht-PSE (hier auch als "verunreinigendes Protein" bezeichnet), stärker bevorzugt weniger als etwa 20 % nicht-PSE, noch stärker bevorzugt weniger als etwa 10 % nicht-PSE und am stärksten bevorzugt weniger als etwa 5 % nicht-PSE. Wenn die PSE oder ein biologisch aktiver Teil davon rekombinant hergestellt 20 worden ist, ist sie/er auch im wesentlichen frei von Kulturmedium, d.h. das Kulturmadium macht weniger als etwa 20 %, stärker bevorzugt weniger als etwa 10 % und am stärksten bevorzugt weniger als etwa 5 % des Volumens der Proteinpräparation aus. Der Begriff "im wesentlichen frei von chemischen Vorstufen 25 oder anderen Chemikalien" umfaßt PSE-Präparationen, in denen das Protein von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien getrennt ist, die an der Synthese des Proteins beteiligt sind. Bei einer Ausführungsform umfaßt der Begriff "im wesentlichen frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien" PSE- 30 Präparationen mit weniger als etwa 30 % (bezogen auf das Trocken-gewicht) chemischen Vorstufen oder nicht-PSE-Chemikalien, stärker bevorzugt weniger als etwa 20 % chemischen Vorstufen oder nicht-PSE-Chemikalien, noch stärker bevorzugt weniger als etwa 10 % chemischen Vorstufen oder nicht-PSE-Chemikalien und am stärksten 35 bevorzugt weniger als etwa 5 % chemischen Vorstufen oder nicht-PSE-Chemikalien. Bei bevorzugten Ausführungsformen weisen isolierte Proteine oder biologisch aktive Teile davon keine ver-unreinigenden Proteine aus dem gleichen Organismus auf, aus dem die PSE stammt. Im Falle des erfindungsgemäßen Proteins, das die 40 Sequenz, die in SEQ ID NO:10 gezeigt wird, oder das von einem Gen, das SEQ ID NO:9 umfasst, codiert wird, ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Sequenz mit zwei Met beginnt. Dies kann dazu führen, dass bei der Translation einer entsprechenden codierenden Nukleinsäuresequenz zwei Derivate des erfindungsgemäßen Proteins 45 exprimiert werden, beginnend am ersten oder zweiten Met. Das Expressionsverhältnis zwischen beiden Derivaten kann je nach Expressionsart oder Wirtsorganismus zwischen 0 und 1 schwanken.

Umfasst ist somit PSE, das beide genannte Derivate oder nur eins der Derivate enthält. Die beiden Derivate können unterschiedliche Aktivitäten, Lokalisationen, Halbwertszeiten, Regulationsmechanismen etc. aufweisen. Diese Proteine werden gewöhnlich durch rekombinante Expression zum Beispiel Physcomitrella-, Phytophthora-, Cryptecodinium- oder Thraustochytrium-PSE in Pflanzen wie Physcomitrella patens bzw. o.g. oder Mikroorganismen, beispielsweise Bakterien, wie E. coli, Bacillus subtilis, C. glutamicum, Pilzen, wie Mortierella, Hefe, wie Saccharomyces, oder Ciliaten wie Colpidium oder Algen wie Phaeodactylum hergestellt.

Eine erfindungsgemäße isolierte PSE oder ein Teil davon kann auch am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Physcomitrella, Phytophthora, Cryptecodinium oder Thraustochytrium notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen. Bei bevorzugten Ausführungsformen umfaßt das Protein oder der Teil davon eine Aminosäuresequenz, die ausreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12 ist, daß das Protein oder der Teil davon die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Physcomitrella, Phytophthora, Cryptecodinium oder Thraustochytrium notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilzunehmen, beibehält. Der Teil des Proteins ist vorzugsweise ein biologisch aktiver Teil, wie hier beschrieben. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat eine erfindungsgemäße PSE eine der in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12 gezeigten Aminosäuresequenzen. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat die PSE eine Aminosäuresequenz, die von einer Nukleotidsequenz codiert wird, die, zum Beispiel unter stringenten Bedingungen, an eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 hybridisiert. Bei noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat die PSE eine Aminosäuresequenz, die von einer Nukleotidsequenz codiert wird, die mindestens etwa 50 bis 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 70 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 %, 90 bis 95 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder noch homologer zu einer der Aminosäuresequenzen der SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12 ist. Die erfindungsgemäße bevorzugte PSE besitzt vorzugsweise auch mindestens eine der hier beschriebenen PSE-Aktivitäten. Zum Beispiel umfaßt eine erfindungsgemäße bevorzugte PSE eine Aminosäuresequenz, die von einer Nukleotidsequenz codiert wird, die, zum Beispiel unter stringenten Bedingungen, an eine Nukleotid-

sequenz der SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 hybridisiert und am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in *Physcomitrella*, *Phytophthora*, *Cryptocodinium* oder *Thraustochytrium* notwendigen Verbindungen 5 oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann oder eine oder mehrere polyungesättigte Fettsäuren mit wenigstens zwei Doppelbindungen und einer Kettenlänge von C₁₆ oder C₁₈ verlängern kann.

- 10 Bei anderen Ausführungsformen ist die PSE im wesentlichen homolog zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12 und behält die funktionelle Aktivität des Proteins einer der Sequenzen der SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, 15 SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12 bei, ihre Aminosäuresequenz unterscheidet sich jedoch aufgrund von natürlicher Variation oder Mutagenese, wie eingehend im obigen Unterabschnitt I beschrieben. Bei einer weiteren Ausführungsform ist die PSE folglich ein Protein, das eine Aminosäuresequenz umfaßt, die mindestens etwa 20 50 bis 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 70 % und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 %, 90 bis 95 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder noch homologer zu einer vollständigen Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 25 und SEQ ID NO:12 ist und zumindest eine der hier beschriebenen PSE-Aktivitäten aufweist. Bei einer anderen Ausführungsform betrifft die Erfindung ein vollständiges *Physcomitrella*-, *Phytophthora*-, *Cryptocodinium*- oder *Thraustochytrium* -Protein, das im wesentlichen homolog zu einer vollständigen Aminosäure- 30 sequenz der SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12 ist.

Biologisch aktive Teile einer PSE umfassen Peptide, umfassend Aminosäuresequenzen, die von der Aminosäuresequenz einer PSE 35 hergeleitet sind, z.B. eine in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:12 gezeigte Aminosäuresequenz oder die Aminosäuresequenz eines Proteins, das zu einer PSE homolog ist, welche weniger Aminosäuren als die Vollängen-PSE oder das Vollängenprotein aufweisen, das zu einer 40 PSE homolog ist, und zumindest eine Aktivität einer PSE aufweisen. Gewöhnlich umfassen biologisch aktive Teile (Peptide, z.B. Peptide, die zum Beispiel 5, 10, 15, 20, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 100 oder mehr Aminosäuren lang sind) eine Domäne oder ein Motiv mit mindestens einer Aktivität einer PSE. Überdies 45 können andere biologisch aktive Teile, in denen andere Bereiche des Proteins deletiert sind, durch rekombinante Techniken hergestellt und bezüglich einer oder mehrerer der hier beschriebenen

Aktivitäten untersucht werden. Die biologisch aktiven Teile einer PSE umfassen vorzugsweise ein/eine oder mehrere ausgewählte Domänen/Motive oder Teile davon mit biologischer Aktivität.

5 Solche Domänen und Motive können zum Teil durch Sequenzanalyse, z.B. mithilfe von EDV-gestützten Methoden, identifiziert werden.

In den erfindungsgemäß Sequenzen wurden z.B. sogenannte KK-Methoden gefunden.

10 Kermode 1996, Critical Reviews in Plant Sciences 15 (4):285-423 beschreibt KK-Motive, ein Doppel-Lysin, das vornehmlich als KKXX oder K X K XXX Motiv gefunden wird und ein Recycling vom ER zum Golgi Apparat und damit die Verweilzeit des Proteins und seiner
15 Enzymaktivität an einem bestimmten Ort, insbesondere dem ER beeinflusst.

Doppel-Lysin-Motive wurden z.B. auch in Δ12-Desaturasen gefunden (Arondel et al. 1992, Science 258:1353) und liegen auch in
20 erfindungsgemäß Elongasen vor. Insbesondere sind solche Motive C-terminal lokalisierbar beschrieben. In erfindungsgemäß Sequenzen findet sich eine auffällige Anhäufung von Lysinen am C-Terminus.

25 Moos Elongase PSE1: C-Terminus KQKGAKTE
SEQ ID NO 2: KTKKA
SEQ ID NO 4 KKSTPAAKKTN
SEQ ID NO 6: KHLK

30 Es könnte sich hiermit um eine mögliche Genvariation handeln.

Es gibt Lys Reste, die das Targeting, die Adressierung und Lokalisation am oder im ER beeinflussen. Eine Maskierung dieser Sequenz, Modifizierung oder räumlich Modifikation, der Nähe zum
35 Ende des C-Terminus z.B. durch Fusion mit GFP "green fluorescent protein" kann zur Beeinflussung der Kompartimentierung genutzt werden.

PSEs werden vorzugsweise durch DNA-Rekombinationstechniken
40 hergestellt. Zum Beispiel wird ein das Protein codierendes Nukleinsäuremolekül in einen Expressionsvektor (wie vorstehend beschrieben) kloniert, der Expressionsvektor wird in eine Wirtszelle (wie vorstehend beschrieben) eingebracht, und die PSE wird in der Wirtszelle exprimiert. Die PSE kann dann
45 durch ein geeignetes Reinigungsschema mittels Standard-Proteinreinigungstechniken aus den Zellen isoliert werden. Alternativ zur rekombinanten Expression kann eine PSE, ein -Polypeptid,

oder -Peptid mittels Standard-Peptidsynthesetechniken chemisch synthetisiert werden. Überdies kann native PSE aus Zellen (z.B. Endothelzellen) z.B. unter Verwendung eines Anti-PSE-Antikörpers isoliert werden, der durch Standardtechniken produziert werden kann, wobei eine erfindungsgemäße PSE oder ein Fragment davon verwendet wird.

Die Erfindung stellt auch chimäre PSE-Proteine oder PSE-Fusionsproteine bereit. Wie hier verwendet, umfaßt ein "chimäres PSE-Protein" oder "PSE-Fusionsprotein" ein PSE-Polypeptid, das funktionsfähig an ein nicht-PSE-Polypeptid gebunden ist. Ein "PSE-Polypeptid" betrifft ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz, die einer PSE entspricht, wohingegen ein "nicht-PSE-Polypeptid" ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz betrifft, die einem Protein entspricht, das im wesentlichen nicht homolog zu der PSE ist, z.B. ein Protein, das sich vom der PSE unterscheidet und aus dem gleichen oder einem anderen Organismus stammt. Innerhalb des Fusionsproteins soll der Begriff "funktionsfähig verbunden" bedeuten, daß das PSE-Polypeptid und das nicht-PSE-Polypeptid so miteinander fusioniert sind, daß beide Sequenzen die vorhergesagte, der verwendeten Sequenz zugeschriebene Funktion erfüllen. Das nicht-PSE-Polypeptid kann an den N-Terminus oder den C-Terminus des PSE-Polypeptids fusioniert sein. Bei einer Ausführungsform ist das Fusionsprotein zum Beispiel ein GST-PSE-Fusionsprotein, bei dem die PSE-Sequenzen an den C-Terminus der GST-Sequenzen fusioniert sind. Diese Fusionsproteine können die Reinigung der rekombinannten PSEs erleichtern. Bei einer weiteren Ausführungsform ist das Fusionsprotein eine PSE, die eine heterologe Signalsequenz an ihrem N-Terminus aufweist. In bestimmten Wirtszellen (z.B. Säuger-Wirtszellen) kann die Expression und/oder Sekretion einer PSE durch Verwendung einer heterologen Signalsequenz gesteigert werden.

Ein erfindungsgemäßes chimäres PSE-Protein oder PSE-Fusionsprotein wird durch Standard-DNA-Rekombinationstechniken hergestellt. Zum Beispiel werden DNA-Fragmente, die unterschiedliche Polypeptidsequenzen codieren, gemäß herkömmlicher Techniken im Leseraster aneinander ligiert, indem beispielsweise glatte oder überhängende Enden zur Ligation, Restriktionsenzymspaltung zur Bereitstellung geeigneter Enden, Auffüllen kohäsiver Enden, wie erforderlich, Behandlung mit alkalischer Phosphatase, um ungewollte Verknüpfungen zu vermeiden, und enzymatische Ligation eingesetzt werden. Bei einer weiteren Ausführungsform kann das Fusionsgen durch herkömmliche Techniken, einschließlich DNA-Syntheseautomaten, synthetisiert werden. Alternativ kann eine PCR-Amplifizierung von Genfragmenten unter Verwendung von Ankerprimern durchgeführt werden, die komplementäre Überhänge zwischen

- aufeinanderfolgenden Genfragmenten erzeugen, die anschließend miteinander hybridisiert und reamplifiziert werden können, so daß eine chimäre Gensequenz erzeugt wird (siehe zum Beispiel Current Protocols in Molecular Biology, Hrsgb. Ausubel et al., 5 John Wiley & Sons: 1992). Überdies sind viele Expressionsvektoren kommerziell erhältlich, die bereits eine Fusionseinheit (z.B. ein GST-Polypeptid) codieren. Eine PSE-codierende Nukleinsäure kann in einen solchen Expressionsvektor kloniert werden, so daß die Fusionseinheit im Leseraster mit dem PSE-Protein verbunden ist.
- 10 Homologe der PSE können durch Mutagenese, z.B. durch spezifische Punktmutation oder Verkürzung der PSE, erzeugt werden. Der Begriff "Homologe", wie hier verwendet, betrifft eine variante Form der PSE, die als Agonist oder Antagonist der PSE-Aktivität 15 wirkt. Ein Agonist der PSE kann im wesentlichen die gleiche Aktivität wie die oder einen Teil der biologischen Aktivitäten der PSE beibehalten. Ein Antagonist der PSE kann eine oder mehrere Aktivitäten der natürlich vorkommenden Form der PSE durch zum Beispiel kompetitive Bindung an ein stromabwärts oder -auf- 20 wärts gelegenes Element der Stoffwechselkaskade für Zellmembran-komponenten, welche die PSE umfaßt, oder durch Bindung an eine PSE, welche den Transport von Verbindungen über Zellmembranen vermittelt, hemmen, wodurch die Translokation gehemmt wird.
- 25 Bei einer alternativen Ausführungsform können Homologe der PSE durch Sichten kombinatorischer Banken von Mutanten, z.B. Verkürzungsmutanten, der PSE hinsichtlich PSE-Agonisten- oder -Antagonisten-Aktivität identifiziert werden. Bei einer Ausführungsform wird eine variegierte Bank von PSE-Varianten durch 30 kombinatorische Mutagenese auf Nukleinsäureebene erzeugt und durch eine variegierte Genbank codiert. Eine variegierte Bank von PSE-Varianten kann z.B. durch enzymatische Ligation eines Gemisches von synthetischen Oligonukleotiden in Gensequenzen hergestellt werden, so daß sich ein degenerierter Satz potentieller 35 PSE-Sequenzen als individuelle Polypeptide oder alternativ als Satz größerer Fusionsproteine (z.B. für das Phage-Display), die diesen Satz von PSE-Sequenzen enthalten, exprimieren läßt. Es gibt eine Vielzahl von Verfahren, die zur Herstellung von Banken potentieller PSE-Homologen aus einer degenerierten 40 Oligonukleotidsequenz verwendet werden können. Die chemische Synthese einer degenerierten Gensequenz kann in einem DNA-Syntheseautomaten durchgeführt und das synthetische Gen dann in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert werden. Die Verwendung eines degenerierten Satzes von Genen ermöglicht die 45 Bereitstellung sämtlicher Sequenzen, die den gewünschten Satz an potentiellen PSE-Sequenzen codieren, in einem Gemisch. Verfahren zur Synthese degenerierter Oligonukleotide sind im Fachgebiet

bekannt [siehe z.B. Narang, S.A. (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al., (1984) Science 198:1056; Ike et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11:477].

- 5 Zusätzlich können Banken von PSE-Fragmenten zur Herstellung einer variegierten Population von PSE-Fragmenten für das Sichten und für die anschließende Selektion von Homologen einer PSE verwendet werden. Bei einer Ausführungsform kann eine Bank von Fragmenten der codierenden Sequenz durch Behandeln eines doppelsträngigen
10 PCR-Fragmentes einer codierenden PSE-Sequenz mit einer Nuklease unter Bedingungen, unter denen Doppelstrangbrüche nur etwa einmal pro Molekül erfolgen, Denaturieren der doppelsträngigen DNA, Renaturieren der DNA unter Bildung doppelsträngiger DNA, welche Sense/Antisense-Paare von verschiedenen Produkten mit
15 Doppelstrangbrüchen umfassen kann, Entfernen einzelsträngiger Abschnitte aus neu gebildeten Duplices durch Behandlung mit S1-Nuklease und Ligieren der resultierenden Fragmentbank in einen Expressionsvektor erzeugt werden. Mit diesem Verfahren kann eine Expressionsbank hergeleitet werden, die N-terminale, C-terminale
20 und interne Fragmente der PSE verschiedener Größen codiert.

Im Fachgebiet sind mehrere Techniken für das Sichten von Genprodukten in kombinatorischen Banken, die durch Punktmutationen oder Verkürzung hergestellt worden sind, und für das Sichten von
25 cDNA-Banken nach Genprodukten mit einer ausgewählten Eigenschaft bekannt. Diese Techniken lassen sich an das schnelle Sichtung der Genbanken anpassen, die durch kombinatorische Mutagenese von PSE-Homologen erzeugt worden sind. Die am häufigsten verwendeten Techniken zum Sichtung großer Genbanken, die einer Analyse mit
30 hohem Durchsatz unterworfen werden können, umfassen gewöhnlich das Klonieren der Genbank in replizierbare Expressionsvektoren, Transformieren von geeigneten Zellen mit der resultierenden Vektorenbank und Exprimieren der kombinatorischen Gene unter Bedingungen, unter denen der Nachweis der gewünschten Aktivität
35 die Isolation des Vektors, der das Gen codiert, dessen Produkt nachgewiesen wurde, erleichtert. Recursive-Ensemble-Mutagenese (REM), eine neue Technik, die die Häufigkeit funktioneller Mutanten in den Banken erhöht, kann in Kombination mit den Sichtungstests zur Identifikation von PSE-Homologen verwendet
40 werden [Arkin und Yourvan (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-7815; Delgrave et al. (1993) Protein Engineering 6(3):327-331]. Es können auch vorteilhaft Kombinationen der oben genannten Methoden verwendet werden.
45 Eine weitere bekannte Technik zur Veränderung von katalytischen Eigenschaften von Enzymen bzw. deren codierenden Genen ist das sogenannte "Gen-Shuffling" (siehe z.B. WO 97/20078 oder

WO 98/13487), das eine Kombination von Genfragmenten darstellt, wobei diese Neukombination zusätzlich noch durch fehlerhafte Polymerasekettenreaktionen variiert werden kann und somit eine hohe zu testende Sequenzdiversität schafft. Voraus-
5 setzung für den Einsatz eines solchen Ansatzes ist jedoch ein geeignetes Screeningsystem, um die erstellte Gendiversität auf Funktionalität zu überprüfen.
Insbesondere für die Sichtung von Elongaseaktivitäten ist ein Sichtungsverfahren Voraussetzung, das PUFA-abhängig Enzym-
10 aktivität(en) erfaßt. Bzgl. Elongaseaktivitäten mit Spezifität für PUFAs kann man in Mucor-Species, die durch bekannte Transformationsverfahren mit gewünschten Genkonstrukten transformierbar sind, die Toxizität von Arachidonsäure in Anwesenheit eines toxischen Metaboliten (hier: Salicylsäure oder Salicylsäure-
15 derivate) nutzen (Eroshin et al., Mikrobiologiya, Vol. 65, No.1, 1996, Seiten 31-36), um eine wachstumsbasierte Erstsichtung durchzuführen. Resultierende Klone können dann einer Analyse ihrer Lipidinhaltstoffe mittels Gaschromatographie und Massenspektroskopie unterzogen werden, um Edukte und Produkte in Art
20 und Menge zu erfassen.

Bei einer weiteren Ausführungsform können Tests auf Zellbasis zur Analyse einer variierten PSE-Bank unter Verwendung von weiteren im Fachgebiet bekannten Verfahren ausgenutzt werden.

25 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung einen Antikörper, der spezifisch mit dem Polypeptid der vorliegenden Erfindung oder Teilen, z.B. Epitopen, eines solchen Proteins bindet. Der erfindungsgemäße Antikörper kann verwendet
30 werden, um andere Elongasen, insbesondere PSEs, zu identifizieren und zu isolieren. Diese Antikörper können monoklonale Antikörper, polyklonale Antikörper oder synthetische Antikörper sowie Fragmente dieser Antikörper, wie z.B. Fab-, Fv- oder scFV-Fragmente usw., sein. Monoklonale Antikörper können z.B. nach Verfahren,
35 wie ursprünglich beschrieben bei Köhler und Milstein, Nature 256 (1975), 485, und Galfrö, Meth. Enzymol. 73 (1981), hergestellt werden. Antikörper und Fragmente davon können auch hergestellt werden nach z.B. in Harlow & Lane, "Antibodies, a Laboratory Manual", CSH, Press, Cold Spring Harbor, 1988. Diese Antikörper
40 können verwendet werden, um z.B. die erfindungsgemäßen Proteine zu präzipitieren und lokalisieren oder um die Synthese dieser Proteine z.B. in rekombinanten Organismen zu überprüfen sowie für die Identifikation von Verbindungen, die mit den erfindungsgemäßen Proteinen interagieren. In vielen Fällen ist die Bindung
45 von Antikörpern mit Antigenen äquivalent zu der Bindung anderer Liganden und Antiliganden.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Identifikation eines Agonisten oder Antagonisten von Elongasen, insbesondere PSEs, umfassend

- 5 a) in Kontaktbringen der Zellen, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung exprimieren, mit einem Kandidatenstoff;
 - b) Testen der PSE-Aktivität;
 - 10 c) Vergleichen der PSE-Aktivität mit einer Standardaktivität in Abwesenheit des Kandidatenstoffs, wobei ein Anstieg der PSE-Aktivität über den Standard anzeigt, daß der Kandidatenstoff ein Agonist und eine Verringerung der PSE-Aktivität anzeigt, daß der Kandidatenstoff ein Antagonist ist.
- 15 Der genannte Kandidatenstoff kann ein chemisch synthetisierter oder mikrobiologisch produzierter Stoff sein und z.B. in Zellextrakten von z.B. Pflanzen, Tieren oder Mikroorganismen auftreten. Weiterhin kann der genannte Stoff zwar im Stand der Technik bekannt sein, aber bisher nicht bekannt sein als die Aktivität der PSEs steigernd oder reprimierend. Das Reaktionsgemisch kann ein zellfreier Extrakt sein oder eine Zelle oder Zellkultur umfassen. Geeignete Methoden sind dem Fachmann bekannt und werden z.B. allgemein beschrieben in Alberts, Molecular Biology of the cell, 3rd Edition (1994), z.B. Kapitel 17. Die genannten Stoffe können z.B. zu dem Reaktionsgemisch oder dem Kulturmedium zugegeben werden oder den Zellen injiziert werden oder auf eine Pflanze gesprüht werden.
- 30 Wenn eine Probe, die ein nach der erfindungsgemäßen Methode aktiven Stoff beinhaltet, identifiziert wurde, dann ist es entweder möglich, den Stoff direkt von der ursprünglichen Probe zu isolieren oder man kann die Probe in verschiedene Gruppen teilen, z.B. wenn sie aus einer Vielzahl von verschiedenen Komponenten besteht, um so die Zahl der verschiedenen Substanzen pro Probe zu reduzieren und dann das erfindungsgemäße Verfahren mit einer solchen "Unterprobe" der ursprünglichen Probe zu wiederholen. Abhängig von der Komplexität der Probe können die oben beschriebenen Schritte mehrmals wiederholt werden, vorzugsweise bis die 40 gemäß der erfindungsgemäßen Methode identifizierte Probe nur noch eine geringe Anzahl von Substanzen oder nur noch eine Substanz umfaßt. Vorzugsweise wird der gemäß der erfindungsgemäßen Methode identifizierte Stoff oder Derivate davon weiter formuliert, so, daß er für die Anwendung in der Pflanzenzüchtung oder Pflanzenzell- oder Gewebekultur geeignet ist.

64

Die Stoffe, die gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren getestet und identifiziert wurden, können sein: Expressionsbibliotheken, z.B. cDNA-Expressionsbibliotheken, Peptide, Proteine, Nukleinsäuren, Antikörper, kleine organische Stoffe, Hormone, PNAs oder ähnliches (Milner, Nature Medicin 1 (1995), 879-880; Hupp, Cell. 83 (1995), 237-245; Gibbs, Cell. 79 (1994), 193-198 und darin zitierte Referenzen). Diese Stoffe könne auch funktionelle Derivate oder Analogon der bekannten Inhibitoren oder Aktivatoren sein. Verfahren zur Herstellung von chemischen Derivaten oder Analogon 10 sind dem Fachmann bekannt. Die genannten Derivate und Analogon können gemäß Verfahren nach dem Stand der Technik getestet werden. Weiterhin kann computergestütztes Design oder Peptidomimetics zur Herstellung geeigneter Derivate und Analogon verwendet werden. Die Zelle oder das Gewebe, die/das für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden kann, ist vorzugsweise eine erfindungsgemäße Wirtszelle, Pflanzenzelle oder ein Pflanzengewebe, wie in den oben genannten Ausführungsformen beschrieben.

Entsprechend betrifft die vorliegende Erfindung auch einen Stoff, 20 der gemäß den vorstehenden erfindungsgemäßen Verfahren identifiziert wurde. Der Stoff ist z.B. ein Homolog der erfindungsgemäßen PSE. Homologe der PSEs können durch Mutagenese, z.B. durch Punktmutation oder Deletion der PSE, erzeugt werden. Hierin verwendet wird der Begriff "Homolog" als eine variante Form der PSEs, die 25 als Agonist oder Antagonist für die Aktivität der PSEs wirkt. Ein Agonist kann die im wesentlichen gleiche oder einen Teil der biologischen Aktivität der PSEs haben. Ein Antagonist der PSEs kann eine oder mehr Aktivitäten der natürlich vorkommenden Formen der PSEs inhibieren, z.B. kompetitiv an ein Downstream oder Upstream 30 gelegenes Mitglied der Fettsäuresynthese-Stoffwechselwege, die die PSEs einschließen, binden oder an PSEs binden und dabei die Aktivität reduzieren oder inhibieren.

Folglich betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Antikörper 35 oder ein Fragment davon, wie sie hierin beschrieben werden, der die Aktivität der erfindungsgemäßen PSEs inhibiert.

Bei einem Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Antikörper, der spezifisch den erfindungsgemäßen oben beschriebenen 40 Agonisten oder Antagonisten erkennt bzw. bindet.

Ein weiterer Aspekt betrifft eine Zusammensetzung, die den Antikörper, den nach dem erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten Stopp oder das Antisense-Molekül umfaßt.

E. Erfindungsgemäße Verwendungen und Verfahren

Die hier beschriebenen Nukleinsäuremoleküle, Proteine, Proteinhomologen, Fusionsproteine, Antikörper, Primer, Vektoren und Wirtszellen können bei einem oder mehreren der nachstehenden Verfahren verwendet werden: Identifikation *Physcomitrella patens*, *Cryptocodonium*, *Phytophthora infestans* oder *Thraustochytrium* und verwandten Organismen, Kartierung der Genome von Organismen, die mit *Physcomitrella*, *Phytophthora*, *Cryptocodonium* oder *Thraustochytrium* verwandt sind, Identifikation und Lokalisierung von *Physcomitrella*-, *Phytophthora*-, *Cryptocodonium*- oder *Thraustochytrium* -Sequenzen von Interesse, Evolutionsstudien, Bestimmung von PSE-Proteinbereichen, die für die Funktion notwendig sind, Modulation einer PSE-Aktivität; Modulation des Stoffwechsels einer oder mehrerer Zellmembrankomponenten; Modulation des Transmembrantransports einer oder mehrerer Verbindungen sowie Modulation der zellulären Produktion einer gewünschten Verbindung, wie einer Feinchemikalie. Die erfindungsgemäßen PSE-Nukleinsäuremoleküle haben eine Vielzahl von Verwendungen. Sie können zunächst zur Identifikation eines Organismus als *Physcomitrella*, *Phytophthora*, *Cryptocodonium* oder *Thraustochytrium* oder als naher Verwandter davon verwendet werden. Sie können auch zur Identifikation des Vorliegens von *Physcomitrella*, *Cryptocodonium*, *Phytophthora* oder *Thraustochytrium* oder eines Verwandten davon in einer Mischpopulation von Mikroorganismen verwendet werden. Die Erfindung stellt die Nukleinsäuresequenzen einer Reihe von *Physcomitrella*-, *Phytophthora*-, *Cryptocodonium*- oder *Thraustochytrium* -Genen bereit; durch Sondieren der extrahierten genetischen DNA einer Kultur einer einheitlichen oder gemischten Population von Mikroorganismen unter stringenten Bedingungen mit einer Sonde, die einen Bereich eines *Physcomitrella*-, *Cryptocodonium*-, *Phytophthora*- oder *Thraustochytrium* -Gens oder von Teilen davon überspannt, das für diesen Organismus einzigartig ist, kann man bestimmen, ob dieser Organismus vorliegt. *Physcomitrella*, *Cryptocodonium*, *Phytophthora* oder *Thraustochytrium* selbst werden zur kommerziellen Produktion mehrfach ungesättigter Säuren verwendet. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren eignen sich darüber hinaus zur PUFA-Produktion auch in anderen Organismen insbesondere wenn erreicht werden soll, daß resultierende PUFAs auch in die Triacylglycerolfraktion eingebaut werden sollen.

Ferner können die erfindungsgemäßen Nukleinsäure- und Proteinmoleküle als Marker für spezifische Bereiche des Genoms dienen. Diese sind nicht nur zur Kartierung des Genoms, sondern auch für funktionelle Studien von *Physcomitrella*-, *Phytophthora*-, *Cryptocodonium*- oder *Thraustochytrium* -Proteinen geeignet. Zur Identifikation des Genombereichs, an den ein bestimmtes DNA-bindendes

Protein von *Physcomitrella*, *Cryptothecodium*, *Phytophthora* oder *Thraustochytrium* bindet, könnte das *Physcomitrella*-, *Cryptothecodium*-, *Phytophthora*- oder *Thraustochytrium* -Genom zum Beispiel gespalten werden und die Fragmente mit dem DNA-bindenden Protein inkubiert werden. Diejenigen, die das Protein binden, können zusätzlich mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen, vorzugsweise mit leicht nachweisbaren Markierungen, sondiert werden; die Bindung eines solchen Nukleinsäuremoleküls an das Genomfragment ermöglicht die Lokalisierung des Fragments auf der Genomkarte von *Physcomitrella*, *Phytophthora*, *Cryptothecodium* oder *Thraustochytrium* und erleichtert, wenn dies mehrmals mit unterschiedlichen Enzymen durchgeführt wird, eine rasche Bestimmung der Nukleinsäuresequenz, an die das Protein bindet. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle können zudem ausreichend homolog zu den Sequenzen verwandter Arten sein, daß diese Nukleinsäuremoleküle als Marker für die Konstruktion einer genomischen Karte bei verwandten Pilzen oder Algen dienen können.

Die erfindungsgemäßen PSE-Nukleinsäuremoleküle eignen sich auch für Evolutions- und Proteinstruktur-Untersuchungen. Die Stoffwechsel- und Transportprozesse, an denen die erfindungsgemäßen Moleküle beteiligt sind, werden von vielen prokaryotischen und eukaryotischen Zellen genutzt; durch Vergleich der Sequenzen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle mit solchen, die ähnliche Enzyme aus anderen Organismen codieren, kann der Evolutions-Verwandschaftsgrad der Organismen bestimmt werden. Entsprechend ermöglicht ein solcher Vergleich die Bestimmung, welche Sequenzbereiche konserviert sind und welche nicht, was bei der Bestimmung von Bereichen des Proteins hilfreich sein kann, die für die Enzymfunktion essentiell sind. Dieser Typ der Bestimmung ist für Proteinengineering-Untersuchungen wertvoll und kann einen Hinweis darauf geben, wieviel Mutagenese das Protein tolerieren kann, ohne die Funktion zu verlieren.

Die Manipulation der erfindungsgemäßen PSE-Nukleinsäuremoleküle kann zur Produktion von PSEs mit funktionellen Unterschieden zu den Wildtyp-PSEs führen. Die Effizienz oder Aktivität dieser Proteine kann verbessert sein, sie können in größeren Anzahlen als gewöhnlich in der Zelle zugegen sein, oder ihre Effizienz oder Aktivität kann verringert sein. Verbesserte Effizienz oder Aktivität bedeutet beispielsweise, daß das Enzym eine höhere Selektivität und/oder Aktivität, vorzugsweise eine mindestens 10 % höhere, besonders bevorzugt eine mindestens 20 % höhere Aktivität, ganz besonders bevorzugt eine mindestens 30 % höhere Aktivität als das ursprüngliche Enzym aufweist.

Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die die Veränderung einer erfindungsgemäßen PSE die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie, welche ein solches verändertes Protein enthält, direkt beeinflussen kann.

5 Die Gewinnung von Feinchemikalien-Verbindungen aus Kulturen von Ciliaten, Algen oder Pilzen im großen Maßstab ist signifikant verbessert, wenn die Zelle die gewünschten Verbindungen sezerniert, da diese Verbindungen aus dem Kulturmedium (im Gegensatz zur Extraktion aus der Masse der gezüchteten Zellen) leicht

10 gereinigt werden können. Ansonsten lässt sich die Reinigung verbessern, wenn die Zelle *in vivo* Verbindungen in einem spezialisierten Kompartiment mit einer Art Konzentrationsmechanismus speichert. Bei Pflanzen, die PSEs exprimieren, kann ein gesteigerter Transport zu besserer Verteilung innerhalb des

15 Pflanzengewebes und der -organe führen. Durch Vergrößern der Anzahl oder der Aktivität von Transportermolekülen, welche Feinchemikalien aus der Zelle exportieren, kann es möglich sein, die Menge der produzierten Feinchemikalie, die im extrazellulären Medium zugegen ist, zu steigern, wodurch Ernte und Reinigung oder

20 bei Pflanzen eine effizientere Verteilung erleichtert werden. Zur effizienten Überproduktion einer oder mehrerer Feinchemikalien sind dagegen erhöhte Mengen an Cofaktoren, Vorläufermolekülen und Zwischenverbindungen für die geeigneten Biosynthesewege erforderlich. Durch Vergrößern der Anzahl und/oder der Aktivität von

25 Transporterproteinen, die am Import von Nährstoffen, wie Kohlenstoffquellen (d.h. Zuckern), Stickstoffquellen (d.h. Aminosäuren, Ammoniumsalzen), Phosphat und Schwefel, beteiligt sind, kann man die Produktion einer Feinchemikalie aufgrund der Beseitigung aller Einschränkungen des Nährstoffangebots beim Biosynthese-

30 prozeß verbessern. Fettsäuren, wie PUFAs, und Lipide, die PUFAs enthalten, sind selbst wünschenswerte Feinchemikalien; durch Optimieren der Aktivität oder Erhöhen der Anzahl einer oder mehrerer erfindungsgemäßer PSEs, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Stören der Aktivität

35 einer oder mehrerer PSEs, die am Abbau dieser Verbindungen beteiligt sind, kann man somit die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Fettsäure- und Lipidmoleküle in Ciliaten, Algen, Pflanzen, Pilzen, Hefen oder anderen Mikroorganismen steigern.

40 Die Manipulation eines oder mehrerer erfindungsgemäßer PSE-Gene kann ebenfalls zu PSEs mit veränderten Aktivitäten führen, welche die Produktion einer oder mehrerer gewünschter Feinchemikalien aus Algen, Pflanzen, Ciliaten oder Pilzen indirekt beeinflussen.

45 Die normalen biochemischen Stoffwechselprozesse führen z.B. zur Produktion einer Vielzahl an Abfallprodukten (z.B. Wasserstoffperoxid und andere reaktive Sauerstoffspezies), die diese Stoff-

wechselprozesse aktiv stören können [z.B. nitriert Peroxynitrit bekanntlich Tyrosin-Seitenketten, wodurch einige Enzyme mit Tyrosin im aktiven Zentrum inaktiviert werden, Groves, J.T. (1999) Curr. Opin. Chem. Biol. 3(2);226-235]. Diese Abfallprodukte werden zwar üblicherweise ausgeschieden, aber die zur fermentativen Produktion im großen Maßstab verwendeten Zellen werden für die Überproduktion einer oder mehrerer Feinchemikalien optimiert und können somit mehr Abfallprodukte produzieren als für eine Wildtypzelle üblich. Durch Optimieren der Aktivität einer oder mehrerer erfindungsgemäßer PSEs, die am Export von Abfallmolekülen beteiligt sind, kann man die Lebensfähigkeit der Zelle verbessern und eine effiziente Stoffwechselaktivität aufrechterhalten. Auch das Vorliegen hoher intrazellulärer Mengen der gewünschten Feinchemikalie kann tatsächlich für die Zelle 15 toxisch sein, so daß man durch Steigern der Fähigkeit der Zelle zur Sekretion dieser Verbindungen die Lebensfähigkeit der Zelle verbessern kann.

Die erfindungsgemäßen PSEs können ferner so manipuliert sein, daß 20 die relativen Mengen verschiedener Lipid- und Fettsäuremoleküle verändert werden. Dies kann eine entscheidende Auswirkung auf die Lipidzusammensetzung der Zellmembran haben. Da jeder Lipiddtyp unterschiedliche physikalische Eigenschaften hat, kann die Veränderung der Lipidzusammensetzung einer Membran- 25 fluidität signifikant verändern. Änderungen der Membranfluidität können den Transport von Molekülen über die Membran beeinflussen, was, wie vorstehend erläutert, den Export von Abfallprodukten oder der produzierten Feinchemikalie oder den Import notwendiger Nährstoffe modifizieren kann. Diese Änderungen der Membranfluidität können auch die Integrität der Zelle entscheidend beeinflussen; Zellen mit vergleichsweise schwächeren Membranen sind anfälliger gegenüber abiotischen und biotischen Stressbedingungen, welche die Zelle beschädigen oder abtöten können. Durch Manipulieren von PSEs, die an der Produktion von Fettsäuren 30 und Lipiden für den Membranaufbau beteiligt sind, so daß die resultierende Membran eine Membranzusammensetzung hat, die für die in den Kulturen, die zur Produktion von Feinchemikalien verwendet werden, herrschenden Umweltbedingungen empfänglicher sind, sollte ein größerer Anteil der Zellen überleben und sich vermehren. Größere Mengen an produzierenden Zellen sollten sich 35 in größeren Ausbeuten, höherer Produktion oder Effizienz der Produktion der Feinchemikalie aus der Kultur manifestieren.

Die vorstehend genannten Mutagenesestrategien für PSEs, die zu 40 erhöhten Ausbeuten einer Feinchemikalie führen sollen, sollen nicht beschränkt sein; Variationen dieser Strategien sind dem Fachmann leicht ersichtlich. Unter Verwendung dieser Mechanismen

- und mit Hilfe der hier offenbarten Mechanismen können die erfundungsgemäßen Nukleinsäure- und Proteinmoleküle zur Erzeugung von Algen, Ciliaten, Pflanzen, Tieren, Pilzen oder anderen Mikroorganismen, wie *C. glutamicum*, verwendet werden, die mutierte
- 5 PSE-Nukleinsäure- und Proteinmoleküle exprimieren, so daß die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Verbindung verbessert wird. Diese gewünschte Verbindung kann ein beliebiges natürliches Produkt von Algen, Ciliaten, Pflanzen, Tieren, Pilzen oder Bakterien sein, welches die End-
- 10 produkte von Biosynthesewegen und Zwischenprodukte natürlich vorkommender Stoffwechselwege umfaßt, sowie Moleküle, die im Stoffwechsel dieser Zellen nicht natürlich vorkommen, die jedoch von den erfundungsgemäßen Zellen produziert werden.
- 15 Eine weitere erfundungsgemäße Ausführungsform ist ein Verfahren zur Produktion von PUFAs, wobei das Verfahren das Züchten eines Organismus, der eine erfundungsgemäße Nukleinsäure, ein erfundungsgemäßes Genkonstrukt oder einen erfundungsgemäßen Vektor enthält, welche für ein Polypeptid codieren, das C_{16} -,
- 20 C_{18} - oder C_{20} -Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül um mindestens zwei Kohlenstoffatome unter Bedingungen, unter denen PUFAs in dem Organismus produziert werden, verlängert, umfaßt. Durch dieses Verfahren hergestellte PUFAs lassen sich durch Ernten der Organismen entweder aus der
- 25 Kultur, in der sie wachsen, oder von dem Feld, Aufbrechen und/oder Extrahieren des geernteten Materials mit einem organischen Lösungsmittel isolieren. Aus diesem Lösungsmittel kann das Öl, das Lipide, Phospholipide, Sphingolipide, Glycolipide, Triacylglycerine und/oder freie Fettsäuren mit höherem Gehalt an PUFAs
- 30 enthält, isoliert werden. Durch basische oder saure Hydrolyse der Lipide, Phospholipide, Sphingolipide, Glycolipide, Triacylglycerine können die freien Fettsäuren mit höherem Gehalt an PUFAs isoliert werden. Ein höherer Gehalt an PUFAs bedeutet mindestens 5 %, vorzugsweise 10 %, besonders bevorzugt 20 %,
- 35 ganz besonders bevorzugt 40 % mehr PUFAs als der ursprüngliche Organismus, der keine zusätzliche Nukleinsäure, die für die erfundungsgemäße Elongase codiert, besitzt.
- Vorzugsweise sind die durch dieses Verfahren produzierten
- 40 PUFAs C_{18} -, C_{20} - oder C_{22} -Fettsäuremoleküle mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen, besonders bevorzugt drei oder fünf Doppelbindungen. Diese C_{18} -, C_{20} - oder C_{22} -Fettsäuremoleküle lassen sich aus dem Organismus in Form eines Öls, Lipids oder
- 45 einer freien Fettsäure isolieren. Geeignete Organismen sind beispielsweise die vorstehend erwähnten. Bevorzugte Organismen

sind Mikroorganismen, Tiere oder Pflanzen, besonders bevorzugt Pflanzen oder Algen, ganz besonders bevorzugt transgene Pflanzen.

Eine erfindungsgemäße Ausführungsform sind Öle, Lipide oder Fett-
5 säuren oder Fraktionen davon, die durch das oben beschriebene Verfahren hergestellt worden sind, besonders bevorzugt Öl, Lipid oder eine Fettsäurezusammensetzung, die PUFAs umfassen und von transgenen Pflanzen herrühren.

- 10 Eine Ausführungsform der Erfindung sind Öle, Lipide oder Fett-säuren, die durch das erfindungsgemäße Verfahren hergestellt wurden. Weitere Ausführungsformen der Erfindung sind Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzungen, die PUFAs hergestellt nach dem erfindungsgemäßen Verfahren enthalten und von transgenen Pflanzen
15 stammen, welche eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein Genkonstrukt oder Vektor enthalten.

Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform ist die Verwendung des Öls, Lipids oder der Fettsäurezusammensetzung in Futter-
20 mitteln, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Kit, umfassend die erfindungsgemäße Nukleinsäure, das erfindungsgemäße Genkonstrukt, die erfindungsgemäße Amino-
25 säuresequenz, das erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäuremolekül, den erfindungsgemäßen Antikörper und/oder Zusammensetzung, einen Antagonisten oder Agonisten, der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurde, und/oder erfindungsgemäße Öle, Lipide und/oder Fettsäuren oder eine Fraktion davon. Ebenso kann das
30 Kit die erfindungsgemäßen Wirtszellen, Organismen, Pflanzen oder Teile davon, erntbare Teile der erfindungsgemäßen Pflanzen oder Vermehrungsmaterial oder aber auch den erfindungsgemäßen Antagonisten oder Agonisten umfassen. Die Komponenten des Kits der vorliegenden Erfindung können in geeigneten Containern, bei-
35 spielsweise mit oder in Puffern oder anderen Lösungen verpackt sein. Ein oder mehr der genannten Komponenten können in ein und demselben Container verpackt sein. Zusätzlich oder alternativ können ein oder mehr der genannten Komponenten z.B. auf einer festen Oberfläche adsorbiert sein, z.B. Nitrozellulosefilter,
40 Glasplatten, Chips, Nylonmembranen oder Mikrotiterplatten. Das Kit kann für jede der hierin beschriebenen Methoden und Ausführungsformen verwendet werden, z.B. für die Produktion von Wirtszellen, transgenen Pflanzen, zur Detektion von homologen Sequenzen, zur Identifikation von Antagonisten oder Agonisten
45 usw. Weiterhin kann das Kit Anleitungen für die Verwendung des Kits für eine der genannten Anwendungen enthalten.

Diese Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele weiter veranschaulicht, die nicht als beschränkend aufgefaßt werden sollten. Der Inhalt sämtlicher in dieser Patentanmeldung zitierten Literaturstellen, Patentanmeldungen, Patente und 5 veröffentlichten Patentanmeldungen ist hier durch Bezugnahme aufgenommen.

Beispiele

10 Beispiel 1: Allgemeine Verfahren

a) Allgemeine Klonierungsverfahren:

Klonierungsverfahren, wie beispielsweise Restriktionsspaltungen, 15 Agarosegelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrocellulose- und Nylonmembranen, Verbindung von DNA-Fragmenten, Transformation von Escherichia coli- und Hefe-Zellen, Anzucht von Bakterien und Sequenzanalyse rekombinanter DNA, wurden durchgeführt wie beschrieben in 20 Sambrook et al. [(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6] oder Kaiser, Michaelis und Mitchell [(1994), "Methods in Yeast Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-451-3]. Die Transformation und Anzucht von Algen, wie Chlorella oder Phaeodactylum werden durchgeführt wie beschrieben von El-Sheekh [(1999), Biologia Plantarum 25:209-216] oder Apt et al. [(1996) Molecular and General Genetics 252 (5):872-9].

b) Chemikalien

30

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn im Text nicht anders angegeben, in p. A.-Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Lösungen wurden unter Verwendung 35 von reinem pyrogenfreiem Wasser, im nachstehenden Text als H₂O bezeichnet, aus einer Milli-Q-Wassersystem-Wasserreinigungsanlage (Millipore, Eschborn) hergestellt. Restriktionsendonukleasen, DNA-modifizierende Enzyme und molekularbiologische Kits wurden bezogen von den Firmen AGS (Heidelberg), Amersham (Braunschweig), 40 Biometra (Göttingen), Boehringer (Mannheim), Genomed (Bad Oeynhausen), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), Novagen (Madison, Wisconsin, USA), Perkin-Elmer (Weiterstadt), Pharmacia (Freiburg), Qiagen (Hilden) und Stratagene (Amsterdam, Niederlande). Wenn nicht anders angegeben, wurden sie nach den 45 Anweisungen des Herstellers verwendet.

c) Zellmaterial

Für diese Untersuchungen wurde eine Thraustochytrium-Stamm verwendet, der über die American Type Culture Collection (ATCC-Sammlung) mit der Stammnummer ATCC26185 (Thraustochytrium) verfügbar ist, bzw im Fall von Cryptecodinium vom Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton ((CCMP) West Boothbay Harbour, ME, USA) mit der Stammkultur-Nr. CCMP316 zugänglich ist. Die Algen wurden bei 25 Grad Celsius im Dunkeln kultiviert in Glasröhren, die von unten mit Luft begast wurden. Die Anzucht von Thraustochytrium erfolgte alternativ wie detailliert beschrieben bei Singh & Ward (1997, Advances in Microbiology, 45, 271-311).

Als Kulturmedium für Cryptecodinium wurde das f/2 Kulturmedium mit 10% organischen Medium nach Guillard, R.R.L. verwendet [1975; Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W.L. and Chanley, M.H. (Eds.) Culture of marine Invertebrate animals, NY Plenum Press, pp. 29-60.]: Es enthält

995,5 ml Seewasser (artifiziell)
1 ml NaNO₃ (75 g/l), 1 ml NaH₂PO₄ (5 g/l), 1 ml Trace metal solution, 1 ml Tris/Cl pH 8.0, 0.5 ml f/2 vitamin solution
Trace metal solution: Na₂EDTA (4,36 g/l), FeCl₃ (3,15 g/l), Primary Trace metals: CuSO₄ (10 g/l), ZnSO₄ (22 g/l), CoCl₂ (10 g/l), MnCl₂ (18 g/l), NaMoO₄ (6,3 g/l)
f/2 vitamin solution: Biotin: 10 mg/l, Thiamin 200 mg/l, Vit B12 0,1 mg/l
org-Medium: Na-Aacetat (1 g/l), Glucose (6 g/l), Na-Succinat (3 g/l), Bacto-Trypton (4 g/l), Hefe-Extrakt (2 g/l)

d) Moosmaterial (= Pflanzenmaterial)

Für diese Untersuchung wurden Pflanzen der Art Physcomitrella patens (Hedw.) B.S.G. aus der Sammlung der Abteilung für Genetische Untersuchungen der Universität Hamburg verwendet. Sie stammen von dem Stamm 16/14, der von H.L.K. Whitehouse in Gransden Wood, Huntingdonshire (England) gesammelt und von Engel (1968, Am J Bot 55, 438-446) aus einer Spore subkultiviert wurde. Die Proliferation der Pflanzen erfolgte mittels Sporen und mittels Regeneration der Gametophyten. Das Protonema entwickelte sich aus der haploiden Spore zu chloroplastenreichem Chloronema und chloroplastenarmem Caulonema, woraus sich nach etwa 12 Tagen Knospen bildeten. Diese wuchsen zu Gametophoren mit Antheridien und Archegonien. Nach der Befruchtung entstand der diploide

73

Sporophyt mit kurzer-Seta und Sporenkapsel, in der die Meiosporen reifen.

e) Pflanzenanzucht

5

Die Anzucht erfolgte in einer klimatisierten Kammer bei einer Lufttemperatur von 25°C und einer Lichtintensität von 55 Mikromol-1m-2 (Weißlicht; Phillips TL 65W/25 Fluoreszenzröhre) und einem Licht-Dunkel-Wechsel von 16/8 Stunden. Das Moos wurde ent-
10 weder in Flüssigkultur unter Verwendung von Knop-Medium nach Reski und Abel (1985, Planta 165, 354-358) modifiziert oder auf festem Knop-Medium unter Verwendung von 1 % Oxoidagar (Unipath, Basingstoke, England) angezogen.

15 Die zur RNA- und DNA-Isolation verwendeten Protonemata wurden in belüfteten Flüssigkulturen gezüchtet. Die Protonemata wurden alle 9 Tage zerkleinert und in frisches Kulturmöglichkeit überführt.

f) Kultivierung von Phytophthora infestans

20

Zunächst wurde eine cDNA Bank von Phytophthora infestans erstellt. Hierzu kann der Stamm ATCC 48886 von der American Type Culture Collection Rockville, USA erhalten werden. Abweichend vom Anzuchtpfotokoll beschrieben für den Stamm ATCC 48886 wurden
25 Phytophthora Sporen mit kaltem bidestilliertem Wasser gewaschen und für 6 Stunden im Kühlschrank zur Sporulation gebracht. Danach wurde das Material in Erbsenmedium überführt. Hierzu wurden 150 g Tiefkühlerbsen (Iglu, erhältlich von lokalen Supermärkten) in 1 Liter Wasser für 20 Minuten steril autoklaviert. Das Material
30 wird in 100 ml Kolben bei Raumtemperatur auf einem Kreisschüttler angezogen (200 rpm). Nach zwei Tagen wurden je 2 Kolben und in den darauffolgenden 4 Tagen ebenfalls je 2 Kolben abfiltriert und in Flüssigstickstoff zermörsernt.

35 Beispiel 2: Isolierung von Gesamt-DNA aus Pflanzen und Mikroorganismen wie Thraustochytrium und Cryptecodinium für Hybridisierungsexperimente

40 Die Einzelheiten der Isolation von Gesamt-DNA betreffen die Aufarbeitung von Pflanzenmaterial mit einem Frischgewicht von einem Gramm.

45 CTAB-Puffer: 2 % (Gew./Vol.) N-Acetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid (CTAB); 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA.

N-Laurylsarkosin-Puffer: 10 % (Gew./Vol.) N-Laurylsarkosin;
100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM EDTA.

Das Pflanzenmaterial oder Cryptothecodium- oder Thraustochytrium-
5 Zellmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff in einem Mörser
verrieben, so daß ein feines Pulver erhalten wurde, und in 2-ml-
Eppendorfgefäß überführt. Das gefrorene Pflanzenmaterial wurde
dann mit einer Schicht von 1 ml Zersetzungspuffer (1 ml CTAB-
Puffer, 100 ml N-Laurylsarkosin-Puffer, 20 ml β-Mercaptoethanol
10 und 10 ml Proteinase K-Lösung, 10 mg/ml) überschichtet und eine
Stunde unter kontinuierlichem Schütteln bei 60°C inkubiert. Das
erhaltene Homogenat wurde in zwei Eppendorfgefäß (2 ml) auf-
geteilt und zweimal durch Schütteln mit dem gleichen Volumen
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Zur Phasentrennung
15 wurde eine Zentrifugation bei 8000 × g und RT (= Raumtemperatur
= ~ 23°C) jeweils 15 min lang durchgeführt. Die DNA wurde dann
30 min unter Verwendung von eiskaltem Isopropanol bei -70°C
gefällt. Die gefällte DNA wurde bei 10000 g 30 min bei 4°C
sedimentiert und in 180 ml TE-Puffer (Sambrook et al., 1989,
20 Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6)
resuspendiert. Zur weiteren Reinigung wurde die DNA mit NaCl
(1,2 M Endkonzentration) behandelt und erneut 30 min unter Ver-
wendung des zweifachen Volumens an absolutem Ethanol bei -70°C
gefällt. Nach einem Waschschnitt mit 70 % Ethanol wurde die DNA
25 getrocknet und anschließend in 50 ml H₂O + RNase (50 mg/ml End-
konzentration) aufgenommen. Die DNA wurde über Nacht bei 4°C
gelöst und die RNase-Spaltung wurde anschließend 1 Std. bei
37°C durchgeführt. Die Aufbewahrung der DNA erfolgte bei 4°C.

30 Beispiel 3: Isolierung von Gesamt-RNA und poly(A)⁺-RNA aus
Pflanzen und Mikroorganismen (Cryptothecodium
und Thraustochytrium)

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen wie Lein und
35 Raps etc. erfolgt nach einer bei Logemann et al beschriebenen
Methode (1987, Anal. Biochem. 163, 21) isoliert. Aus Moos kann
die Gesamt-RNA Protonema-Gewebe nach dem GTC-Verfahren (Reski
et al., 1994, Mol. Gen. Genet., 244:352-359) gewonnen werden.

40 RNA Isolation aus Cryptothecodium und Thraustochytrium:

Tiefgefrorene Algenproben (- 70°C) werden in einem eiskaltem
Mörser unter Flüssigkeitstickstoff zu feinem Pulver zerreiben.
2 Volumen Homogenisationsmedium (12,024 g Sorbitol, 40,0 ml 1M
45 Tris-HCl, pH 9 (0,2 M); 12,0 ml 5 M NaCl (0,3 M), 8,0 ml 250 mM
EDTA, 761,0 mg EGTA, 40,0 ml 10% SDS werden auf 200 ml mit H₂O
aufgefüllt und der pH auf 8,5 eingestellt) und 4 Volumen Phenol

75

mit 0,2% Mercaptoethanol werden bei 40-50°C unter gutem Mischen zu gefrorenem Zellpulver gegeben. Danach werden 2 Volumen Chloroform hinzufügen und für 15 min kräftig gerührt. Es wird 10 min bei 10000g zentrifugiert und die wässrige Phase mit Phenol/5 Chloroform (2Vol/2Vol) und abschließend mit Chloroform extra-
hiert.

Das erhaltene Volumen der wässrigen Phase wird mit 1/20 Vol 4 M Na-Acetat (pH 6) und 1 Vol Isopropanol (eiskalt) versetzt und 10 die Nukleinsäuren bei -20°C ÜN gefällt. Es wird 30 min bei 10000 g zentrifugiert und der Überstand abgesogen. Es folgt ein Wasch-
schritt mit 70 % EtOH und erneute Zentrifugation. Das Sediment wird in Tris-Borat-Puffer (80 mM Tris-Borat-Puffer, 10 mM EDTA, pH 7,0). Dann wird der Überstand mit 1/3 Vol 8 M LiCl versetzt,
15 gemischt 30 min bei 4°C inkubiert. Nach erneutem zentrifugieren wird das Sediment mit 70 % Ethanol gewaschen, zentrifugiert und das Sediment in RNase-freiem Wasser gelöst.

Die Isolierung von poly(A)⁺-RNA erfolgt unter Verwendung von Dyna 20 Beads® (Dynal, Oslo, Finnland) nach den Anweisungen im Protokoll des Herstellers.

Nach der Bestimmung der RNA- oder poly(A)⁺-RNA-Konzentration wird die RNA durch Zugabe von 1/10 Volumina 3 M Natriumacetat, pH 4,6,
25 und 2 Volumina Ethanol gefällt und bei -70°C aufbewahrt.

Für die Analyse werden jeweils 20 µg RNA in einem Formaldehyd-
haltigen 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt und auf Nylon Membranen
(Hybond, Amersham) überführt. Der Nachweis spezifischer Trans-
30 kripte wird wie bei Amasino beschrieben durchgeführt ((1986)
Anal. Biochem. 152, 304)).

Isolierung von Gesamt-RNA und poly-(A)⁺ RNA aus Phytophthora infestans:

35 Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy Plant Total RNA Kit (Qiagen, Hilden) und dem darin enthaltenen RLT-Puffer nach Angaben des Herstellers gewonnen. Aus der gewonnenen Gesamt-RNA wurde die poly-(A)⁺ RNA mit dem Poly Attract mRNA Isolation System III der 40 Firma Promega (Heidelberg) nach Angaben des Herstellers isoliert.

Beispiel 4: Konstruktion der cDNA-Bank

Zur Konstruktion der cDNA-Bank aus Physcomitrella, Crypthe-
45 codinium bzw. Thraustochytrium wurde die Erststrangsynthese unter Verwendung von Reverser Transkriptase aus Maus-Leukämie-Virus (Roche, Mannheim, Deutschland) und Oligo-d(T)-Primern, die Zweit-

strangsynthese durch Inkubation mit DNA-Polymerase I, Klenow-Enzym und RNase H-Spaltung bei 12°C (2 Std.), 16°C (1 Std.) und 22°C (1 Std.) erzielt. Die Reaktion wurde durch Inkubation bei 65°C (10 min) gestoppt und anschließend auf Eis überführt.

- 5 Doppelsträngige DNA-Moleküle wurde mit T4-DNA-Polymerase (Roche, Mannheim) bei 37°C (30 min) mit glatten Enden versehen. Die Nukleotide wurden durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Sephadex-G50-Zentrifugiersäulen entfernt. EcoRI/XbaI-Adapter (Pharmacia, Freiburg, Deutschland) wurden mittels T4-DNA-Ligase (Roche, 12°C, über Nacht) an die cDNA-Enden ligiert, mit XbaI nachgeschnitten und durch Inkubation mit Polynukleotidkinase (Roche, 37°C, 30 min) phosphoryliert. Dieses Gemisch wurde der Trennung auf einem Low-Melting-Agarose-Gel unterworfen. DNA-Moleküle über 300 Basenpaaren wurden aus dem Gel eluiert, Phenol-15 extrahiert, auf Elutip-D-Säulen (Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland) konzentriert und an Vektorarme ligiert und in lambda-ZAPII-Phagen oder lambda-ZAP-Express-Phagen unter Verwendung des Gigapack Gold-Kits (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) verpackt, wobei Material des Herstellers verwendet und 20 seine Anweisungen befolgt wurden.

Die Konstruktion einer cDNA Bank für *Phytophthora infestans* erfolgte wie oben beschrieben.

25 Beispiel 5: DNA-Sequenzierung und Computeranalyse

- cDNA-Banken, wie im Beispiel 4 beschrieben, wurden zur DNA-Sequenzierung nach Standardverfahren, insbesondere durch das Kettenterminationsverfahren unter Verwendung des ABI PRISM Big 30 Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction-Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt, Deutschland), verwendet. Die Sequenzierung zu-fälliger, vereinzelter Klone wurde anschließend an die präparative Plasmidgewinnung aus cDNA-Banken über in vivo-Massenexcision und Retransformation von DH10B auf Agarplatten durchgeführt (Ein-35 zelheiten zu Material und Protokoll von Stratagene, Amsterdam, Niederlande). Plasmid-DNA wurde aus über Nacht gezüchteten *E. coli*-Kulturen, die in Luria-Brühe mit Ampicillin (siehe Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6)) gezüchtet worden waren, an einem Qiagen-40 DNA-Präparations-Roboter (Qiagen, Hilden) nach den Protokollen des Herstellers präpariert. Sequenzierprimer mit den folgenden Nukleotidsequenzen wurden verwendet:

- 5' -CAGGAAACAGCTATGACC-3'
45 5' -CTAAAGGGAACAAAAGCTG-3'
5' -TGTAAAACGACGGCCAGT-3'

Die Sequenzen wurden unter Verwendung des Standard-Softwarepaketes EST-MAX, das kommerziell von Bio-Max (München, Deutschland) geliefert wird, prozessiert und annotiert. Durch Nutzung von Vergleichsalgorithmen und unter Verwendung einer Suchsequenz wurde mithilfe des BLAST-Programms nach homologen Genen gesucht (Altschul et al. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.). Eine Sequenz aus Cryptecodinium und Thraustochytrium mit Homologien zur Suchsequenz der Mooselongase aus Physcomitrella patens wurden eingehender charakterisiert.

Beispiel 6a: Identifizierung des Tc_PSE1 und Tc_PSE2-Gens (Tc = Thraustochytrium) sowie des Cc_PSE1 und Cc_PSE2-Gens (Cc = Cryptecodinium cohnii) durch Vergleich mit dem Pp_PSE1-Gen aus Physcomitrella patens.

Die Vollängensequenz der erfindungsgemäßen Mooselongase Pp_PSE1 (Bezeichnung siehe auch Tabelle 2) wurde für die Sequenzvergleiche im TBLASTN Suchalgorhythmus eingesetzt:

MEVVERFYGE LDGKVSQGVN ALLGSFGVEL TDTPPTKGLP LVDSPTPIVL GVSYLTIVI
GGLLWIKARD LKPRASEPFL LQALVLVHNL FCFALSLYMC VGIAYQAITW RYSLWGNAYN
PKHKEMAILV YLFYMSKYVE FMDTVIMILK RSTRQISFLH VYHHSSISLI WWAIAHHAPG
GEAYWSAALN SGVHVLMYAY YFLAACLRSS PKLKNKYLFW GRYLTQFQMF QFMLNLVQAY
YDMKTNAPYP QWLKILFYY MISLLFLFGN FYVQKYIKPS DGKQKGAKTE.

Die vollständige Nukleotidsequenz der Mooselongase Pp_PSE1 cDNA besteht aus etwa 1200 bp. Sie enthält einen offenen Leserahmen von 873 bp, der 290 Aminosäure mit einer berechneten Molekulmasse von 33,4 Da codiert. Die Proteinsequenz besitzt nur 38,5 % Identität und 48,3 % Ähnlichkeit mit einem, z.B. PSE1-, Genprodukt von *Saccharomyces cerevisiae*, das zur Elongation von Fettsäuren mit mittlerer Kettenlänge in der Hefe erforderlich ist (Toke & Martin, 1996, Isolation and characterization of a gene affecting fatty acid elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry 271, 18413-18422).

Die EST-Sequenz CC001042041R sowie TC002034029R und TC002014093R wurden zunächst aufgrund schwacher Homologien mit der Elongase aus Physcomitrella patens (siehe Tabelle 2), dem PSE1 Gen unter anderen Kandidatengenen als Zielgen in Betracht gezogen. In Figur 5 ist das Ergebnis des Vergleiches der Pp_PSE1 Peptidsequenz mit der gefundenen Sequenz dargestellt. Sie ist Teil der erfindungsgemäßen Nukleinsäure aus Seq ID NO:3. (Genname: Tc_PSE1, eigene Datenbank Nr. der Erfinder TC002034029R). Buchstaben zeigen identische Aminosäuren an, während das Pluszeichen eine chemisch ähnliche Aminosäure bedeutet. Die Identitäten bzw. Homologien

aller erfindungsgemäß gefundener Sequenzen gehen aus Tabelle 3 zusammenfassend hervor.

- Die Sequenzierung des vollständigen cDNA Fragmentes aus Klon
5 TC002034029R ergab eine 693 Basenpaare lange Sequenz beginnend mit erster Base im offenen Leseraster. Die Sequenz codiert für ein Polypeptid von 195 Aminosäuren dargestellt in Seq ID NO:4 mit einem Stopcodon in Basenpaarposition übersetzt aus SEQ ID NO:3 in Basenpaarposition 586-588. Der Klon TC002014093R beinhaltet ein
10 nahezu vollständiges Elongase-Polypeptid, wie aus dem Sequenzvergleich in Figur 7 zu ersehen ist. Striche bedeuten identische Aminosäuren während Doppelpunkte und Einzelpunkte chemisch austauschbare, d.h. chemisch äquivalente Aminosäuren darstellen.
Der Vergleich wurde mit der BLOSUM62 Austauschmatrix für Amin-
15 soäuren nach Henikoff & Henikoff durchgeführt ((1992) Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919). Verwendete Parameter: Gap Weight: 8; Average Match: 2.912, Length Weight: 2, Average Mismatch: -2.003.

20 Weiterhin wurde durch den Sequenzvergleich ein zweiter est identifiziert. Dargestellt in Figur 6 ist der Vergleich der Pp_PSE1 Peptidsequenz mit der gefundenen Sequenz. Wenngleich sich die Homologie unter gewählten Parametern auf wenige Aminosäuren beschränkt, so bezieht sich dies auf einen stark konservierten
25 Bereich der PUFA-spezifischen Elongasen. Es wurde daher die Sequenz des vollständigen klonierten Fragmentes ermittelt.
- Die Sequenzierung des vollständigen cDNA Fragmentes aus Klon
TC002014093R ergab eine 955 Basenpaare lange Sequenz beginnend
30 mit erster Base im offenen Leseraster. Diese ist erfindungsgemäß mit SEQ ID NR: 5 angegeben. Die Sequenz codiert für ein Polypeptid von 297 Aminosäuren mit einem Stopcodon in Basenpaarposition 892-894 erfindungsgemäß dargestellt in SEQ ID NO: 6.

35 Mithilfe der Sequenz PpPSE1 wurde der est CC001042041R aus Cryptecodium cohnii codierend für das Gen Cc_PSE1 identifiziert. Der isolierte est CC001042041R, erfindungsgemäß dargestellt als SEQ ID NR: 7 ist 708 Basenpaaren lang mit einem offenen Leseraster ab erster Base von 642 Basenpaaren codierend
40 für 214 Aminosäuren und mit einem Stopcodon in Position 643-645. Die Aminosäuresequenz bis zum Stopcodon ist erfindungsgemäß dargestellt in SEQ ID NR:8.

Neben der Ähnlichkeit mit dem PSE1-Genprodukt kann auch die Ähnlichkeit zur Elongase aus *Saccharomyces cerevisiae* (sce elo 1P) herangezogen werden, die zur Elongation von Fettsäuren mit mittlerer Kettenlänge in der Hefe erforderlich ist (Toke &

Martin, 1996, Isolation and characterization of a gene affecting fatty acid elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry 271, 18413-18422). In Tabelle 3 sind die Identitäten und Homologien erfindungsgemäßer Elongasen untereinander und mit den Elongasen aus *Physcomitrella patens* und aus Hefe dargestellt. Die Angaben wurden mithilfe des Programms GAP als Teilprogramm folgender Software erhalten: Wisconsin Package Version 10.0 (Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc., USA).

10

Tabelle 3:

	Identity/ homology	Tc_PSE1	TC_PSE2	Pp_PSE1	Sce elo 1P
15	Cc_PSE1	47,1% / 40,2%	50,6% / 43,5%	38,5% / 29,4%	45,1% / 33,5%
	Tc_PSE1	100 / 100	n.d.	43,2% / 32,7%	41,9% / 29,9%
	Tc_PSE2	41,7% / 29,5%	100 / 100	39,2% / 30,0	35,4% / 27,8%

Insbesondere lassen sich aus Figuren 5 bis 10 die folgenden Sequenzmotive als Bereiche hoher Homologie und entsprechende daraus abgeleitete Consensussequenzen ableiten, die durch Rückübersetzung der Aminosäuren in Drei-Basenpaar-Codons zu Oligonukleotiden führen, die zur Isolation neuer Elongasen mittels Polymerasekettenreaktion genutzt werden können.

Dies sind insbesondere die in Figur 10 dargestellten Sequenzmotive. Aus diesen Motiven lassen sich Oligonukleotide ableiten und in Kombination mit zwei Oligonukleotiden in PCR-Experimenten zur Isolation weiterer Elongasefragmente einsetzen. Dabei wird zweckmäßigerweise ein Oligonukleotid passend für den konventionell definierten 5'-3' Strang und ein zweites mit einem strangabwärts für den 3'-5' Strang passenden Oligonukleotid konstruiert und synthetisiert. Dabei ergibt sich eine definierbare Anzahl an Primerkombinationen, die durch Permutation der möglichen Varianten begrenzt ist.

35

Dabei können auch Oligo-dT Primer und Varianten davon genutzt werden, z.B. indem die letzte Base Spezifität für einen Pool von Transkripten zuläßt wie z.B: Oligo dT (12-20) X, wobei X ein G, C oder T sein kann. Auch läßt sich eine zweite Base Oligo dT (12-20) XY nutzen, wobei X ein G, C oder A sein kann, während das Y ein A, G, C, oder T sein kann.

Aus oben definierten Sequenzen lassen sich 17- bis 20mere Oligonukleotide ableiten, die unter Variation der Primerkombinationen und Versuchsparameter wie Temperaturprogramm, Mg-Ionenkonzentration etc. zur Isolation von Genfragmenten genutzt werden können. Die so erhaltenen Fragmente können in

geeignete Vektoren kloniert werden und die Sequenz erhaltener Klone zur Identifizierung neuer Elongasen nach gängigen verfahren ermittelt werden.

5 Beispiel 6b: Isolation des cDNA Klons aus *Pythophthora infestans*

Der cDNA Klon mit der Bezeichnung PI001002014R aus *Phytophthora infestans* wurde aus zufällig sequenzierten cDNAs aufgrund von Homologien zur PUFA Elongase aus dem Moos *Physcomitrella patens* 10 identifiziert (ATCCC 48886). Der Klon enthält das in Abbildung 8 dargestellte Konsensus Motiv MYxYYF, wobei abweichend von bisher identifizierten PUFA Elongasen ein Threoninrest als variable Aminosäure x gefunden wurde. Diese weitere Variation kann zur Ableitung von PCR Primern genutzt werden.

15

Beispiel 7: Identifikation von Genen mittels Hybridisierung
(TC002034029R-11 iGenTc-PCE1)

20 Gensequenzen lassen sich zur Identifikation homologer oder heterologer Gene aus cDNA- oder genomischen Banken verwenden.

Homologe Gene (d.h. Volllängen-cDNA-Klone, die homolog sind, oder Homologen) lassen sich über Nukleinsäurehybridisierung unter Verwendung von beispielsweise cDNA-Banken isolieren: Insbesondere zur Isolation von funktionell aktiven Voll-Längengenen der in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 und SEQ ID NO:11 kann die Methode genutzt werden. Je nach der Häufigkeit des Gens von Interesse werden 100000 bis zu 1000000 rekombinante Bakteriophagen plattiert und auf eine 30 Nylonmembran überführt. Nach der Denaturierung mit Alkali wird die DNA auf der Membran z.B. durch UV-Vernetzung immobilisiert. Die Hybridisierung erfolgt bei hoch-stringenten Bedingungen. In wäßriger Lösung werden die Hybridisierung und die Waschschritte bei einer Ionenstärke von 1 M NaCl und einer Temperatur von 68°C 35 durchgeführt. Hybridisierungssonden wurden z.B. durch Markierung mittels radioaktiver (³²P-) Nicktranskription (High Prime, Roche, Mannheim, Deutschland) hergestellt. Die Signale werden mittels Autoradiographie nachgewiesen.

40 Partiell homologe oder heterologe Gene, die verwandt, aber nicht identisch sind, lassen sich analog zum oben beschriebenen Verfahren unter Verwendung niedrig-stringenter Hybridisierungs- und Waschbedingungen identifizieren. Für die wäßrige Hybridisierung wurde die Ionenstärke gewöhnlich bei 1 M NaCl gehalten, wobei 45 die Temperatur nach und nach von 68 auf 42°C gesenkt wurde.

81

Die Isolation von Gensequenzen, die nur zu einer einzelnen Domäne von beispielsweise 10 bis 20 Aminosäuren Homologien aufweisen, läßt sich unter Verwendung synthetischer, radioaktiv markierter Oligonukleotidsonden durchführen. Radioaktiv markierte Oligonukleotide werden mittels Phosphorylierung des 5'-Endes zweier komplementärer Oligonukleotide mit T4-Polynukleotidkinase hergestellt. Die komplementären Oligonukleotide werden aneinander hybridisiert und ligiert, so daß Konkatenere entstehen. Die doppelsträngigen Konkatenere werden beispielsweise durch Nick-transkription radioaktiv markiert. Die Hybridisierung erfolgt gewöhnlich bei niedrig-stringenten Bedingungen unter Verwendung hoher Oligonukleotidkonzentrationen.

Oligonukleotid-Hybridisierungslösung:

15

6 x SSC
0,01 M Natriumphosphat
1 mM EDTA (pH 8)
0,5 % SDS
20 100 mikrog/ml denaturierte Lachssperma-DNA
0,1 % fettarme Trockenmilch

Während der Hybridisierung wird die Temperatur schrittweise auf 5 bis 10°C unter die berechnete Oligonukleotid-Tm oder bis auf Raumtemperatur (bedeutet RT = ~ 23°C in allen Experimenten, wenn nicht anders angegeben) gesenkt, gefolgt von Waschschriften und Autoradiographie. Das Waschen wird mit extrem niedriger Stringenz durchgeführt, zum Beispiel 3 Waschschritte unter Verwendung von 4 x SSC. Weitere Einzelheiten sind wie von Sambrook, J., et al. (1989), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, oder Ausubel, F.M., et al. (1994) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, beschrieben.

35 Der Klon TC002034029R-11 mit dem Gennamen Tc_PCE1_1 ist eine Vollängensequenz einer Elongase aus Thraustochytrium und somit länger als Klon TC002034029R aus Seq. ID No. 3 und Seq. ID No. 4. Die Isolation des Klones erfolgte über Hybridisierungsverfahren wie oben (Beispiel 7) beschrieben. Es handelt sich um eine 1054 Basenpaare lange DNA Sequenz codierend für 271 Aminosäuren mit einem Startcodon in Basenpaarposition 43-45 und einem Stopcodon in Basenpaarposition 856-858.

Beispiel 8: Identifikation von Zielgenen durch Sichtung von Expressionsbanken mit Antikörpern

Es werden cDNA-Sequenzen zur Herstellung von rekombinantem Protein zum Beispiel in *E. coli* verwendet (z.B. Qiagen QIAexpress pQE-System). Die rekombinanten Proteine werden dann gewöhnlich über Ni-NTA-Affinitätschromatographie (Qiagen) affinitätsgereinigt. Die rekombinanten Proteine werden dann zur Herstellung spezifischer Antikörper beispielsweise unter Verwendung von Standardtechniken zur Immunisierung von Kaninchen verwendet. Die Antikörper werden dann unter Verwendung einer Ni-NTA-Säule, die mit rekombinantem Antigen vorgesättigt wird, affinitätsgereinigt, wie von Gu et al., (1994) BioTechniques 17:257-262 beschrieben. Der Antikörper kann dann zur Durchmusterung von Expressions-cDNA-Banken mittels immunologischem Sichtung verwendet werden (Sambrook, J., et al. (1989), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, oder Ausubel, F.M., et al. (1994) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons).

20

Beispiel 9: Plasmide für die Pflanzentransformation

Zur Pflanzentransformation können binäre Vektoren, wie pBinAR verwendet werden (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990) 221-230). Die Konstruktion der binären Vektoren kann durch Ligation der cDNA in Sense- oder Antisense-Orientierung in T-DNA erfolgen. 5' der cDNA aktiviert ein Pflanzenpromotor die Transkription der cDNA. Eine Polyadenylierungssequenz befindet sich 3' von der cDNA.

30

Die gewebespezifische Expression lässt sich unter Verwendung eines gewebespezifischen Promotors erzielen. Beispielsweise kann die samenspezifische Expression erreicht werden, indem der Napin- oder der LeB4- oder der USP-Promotor 5' der cDNA einkloniert wird. Auch jedes andere samenspezifische Promotorelement kann verwendet werden. Zur konstitutiven Expression in der ganzen Pflanze lässt sich der CaMV-35S-Promotor verwenden.

Das exprimierte Protein kann unter Verwendung eines Signalpeptids, beispielsweise für Plastiden, Mitochondrien oder das Endoplasmatische Retikulum, in ein zelluläres Kompartiment dirigiert werden (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285-423). Das Signalpeptid wird 5' im Leseraster mit der cDNA einkloniert, um die subzelluläre Lokalisierung des Fusionsprotein zu erreichen.

Beispiel 10: Transformation von Agrobacterium

Die Agrobacterium-vermittelte Pflanzentransformation kann zum Beispiel unter Verwendung des GV3101- (pMP90-) (Koncz und Schell, 5 Mol. Genet. 204 (1986) 383-396) oder LBA4404- (Clontech) Agrobacterium tumefaciens-Stamms durchgeführt werden. Die Transformation kann durch Standard-Transformationstechniken durchgeführt werden (Deblaere et al., Nucl. Acids. Tes. 13 (1984), 4777-4788).

10

Beispiel 11: Pflanzentransformation

Die Agrobacterium-vermittelte Pflanzentransformation kann unter Verwendung von Standard-Transformations- und Regenerations- 15 techniken durchgeführt werden (Gelvin, Stanton B., Schilperoort, Robert A., Plant Molecular Biology Manual, 2. Aufl., Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1995, in Sect., Ringbuc Zentrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R., Thompson, John E., Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Boca Raton: 20 CRC Press, 1993, 360 S., ISBN 0-8493-5164-2).

Beispielsweise kann Raps mittels Kotyledonen- oder Hypokotyl- transformation transformiert werden (Moloney et al., Plant Cell Report 8 (1989) 238-242; De Block et al., Plant Physiol. 91 25 (1989) 694-701). Die Verwendung von Antibiotika für die Agrobacterium- und Pflanzenselektion hängt von dem für die Transformation verwendeten binären Vektor und Agrobacterium- Stamm ab. Die Rapsselektion wird gewöhnlich unter Verwendung von Kanamycin als selektierbarem Pflanzenmarker durchgeführt.

30

Der Agrobacterium-vermittelte Gentransfer in Lein (*Linum usitatissimum*) lässt sich unter Verwendung von beispielsweise einer von Mlynarova et al. (1994) Plant Cell Report 13:282-285 beschriebenen Technik durchführen.

35 Die Transformation von Soja kann unter Verwendung von beispielsweise einer in EP-A-0 0424 047 (Pioneer Hi-Bred International) oder in EP-A-0 0397 687, US 5,376,543, US 5,169,770 (University Toledo) beschriebenen Technik durchgeführt werden.

40 Die Pflanzentransformation unter Verwendung von Teilchen- beschuß, Polyethylenglycol-vermittelter DNA-Aufnahme oder über die Siliziumcarbonatfaser-Technik ist beispielsweise beschrieben von Freeling und Walbot "The maize handbook" (1993) ISBN 3-540-97826-7, Springer Verlag New York).

45

Beispiel 12: Plasmide für die Pflanzentransformation

Zur Pflanzentransformation können binäre Vektoren, wie pBinAR verwendet werden (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990) 5 221-230). Die Konstruktion der binären Vektoren kann durch Ligation der cDNA in Sense- oder Antisense-Orientierung in T-DNA erfolgen. 5' der cDNA aktiviert ein Pflanzenpromotor die Transkription der cDNA. Eine Polyadenylierungssequenz befindet sich 3' von der cDNA.

10 Die gewebespezifische Expression lässt sich unter Verwendung eines gewebespezifischen Promotors erzielen. Beispielsweise kann die samenspezifische Expression erreicht werden, indem der Napin- oder der LeB4- oder der USP-Promotor 5' der cDNA einkloniert wird. Auch jedes andere samenspezifische Promotorelement kann 15 verwendet werden. Zur konstitutiven Expression in der ganzen Pflanzen lässt sich der CaMV-35S-Promotor verwenden. Insbesondere lassen sich Gene codierend für Elongasen und Desaturasen durch Konstruktion mehrerer Expressionskassetten hintereinander in einen binären Vektor klonieren, um den Stoff- 20 wechselweg in der Pflanzen nachzubilden.

Innerhalb einer Expressionskassette kann das zu exprimierende Protein unter Verwendung eines Signalpeptids, beispielsweise für Plastiden, Mitochondrien oder das Endoplasmatische Retikulum, 25 in ein zelluläres Kompartiment dirigiert werden (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285-423). Das Signalpeptid wird 5' im Leseraster mit der cDNA einkloniert, um die subzelluläre Lokalisierung des Fusionsprotein zu erreichen.

30 Beispiel 13: In vivo-Mutagenese

Die in vivo-Mutagenese von Mikroorganismen kann mittels Passage der Plasmid- (oder einer anderen Vektor-) DNA durch E. coli oder andere Mikroorganismen (z.B. *Bacillus* spp. oder Hefen, 35 wie *Saccharomyces cerevisiae*), bei denen die Fähigkeiten, die Unversehrtheit ihrer genetischen Information aufrechtzuerhalten, gestört ist, erfolgen. Übliche Mutator-Stämme haben Mutationen in den Genen für das DNA-Reparatursystem (z.B. *mutHLS*, *mutD*, *mutT* usw.; als Literaturstelle siehe Rupp, W.D. (1996) DNA repair 40 mechanisms, in: *Escherichia coli and Salmonella*, S. 2277-2294, ASM: Washington). Diese Stämme sind dem Fachmann bekannt. Die Verwendung dieser Stämme ist beispielsweise in Greener, A., und Callahan, M. (1994) Strategies 7:32-34, erläutert. Der Transfer mutierter DNA-Moleküle in Pflanzen erfolgt vorzugsweise nach 45 Selektion und Test der Mikroorganismen. Transgene Pflanzen werden

nach verschiedenen Beispielen im Beispielteil dieses Dokumentes erzeugt.

5 Beispiel 14: Untersuchung der Expression eines rekombinanten Genproduktes in einem transformierten Organismus

Die Aktivität eines rekombinanten Genproduktes im transformierten Wirtsorganismus wurde auf der Transkriptions- und/oder der Translationsebene gemessen.

10 Ein geeignetes Verfahren zur Bestimmung der Menge an Transkription des Gens (ein Hinweis auf die Menge an RNA, die für die Translation des Genproduktes zur Verfügung steht) ist die Durchführung eines Northern-Blots wie unten ausgeführt
15 (als Bezugsstelle siehe Ausubel et al. (1988) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley: New York, oder den oben erwähnten Beispielteil), wobei ein Primer, der so gestaltet ist, daß er an das Gen von Interesse bindet, mit einer nachweisbaren Markierung (gewöhnlich radioaktiv oder chemilumineszent) markiert wird; so
20 daß, wenn die Gesamt-RNA einer Kultur des Organismus extrahiert, auf einem Gel aufgetrennt, auf eine stabile Matrix transferiert und mit dieser Sonde inkubiert wird, die Bindung und das Ausmaß der Bindung der Sonde das Vorliegen und auch die Menge der mRNA für dieses Gen anzeigen. Diese Information zeigt den Grad der
25 Transkription des transformierten Gens an. Zelluläre Gesamt-RNA kann aus Zellen, Geweben oder Organen mit mehreren Verfahren, die alle im Fachgebiet bekannt sind, wie zum Beispiel das von Bormann, E.R., et al. (1992) Mol. Microbiol. 6:317-326 beschriebene, präpariert werden.
30

Northern-Hybridisierung:

Für die RNA-Hybridisierung wurden 20 µg Gesamt-RNA oder 1 µg poly(A)⁺-RNA mittels Gelelektrophorese in Agarosegelen mit
35 einer Stärke von 1,25 % unter Verwendung von Formaldehyd, wie beschrieben in Amasino (1986, Anal. Biochem. 152, 304) aufgetrennt, mittels Kapillaranziehung unter Verwendung von 10 x SSC auf positiv geladene Nylonmembranen (Hybond N+, Amersham, Braunschweig) übertragen, mittels UV-Licht immobilisiert und
40 3 Stunden bei 68°C unter Verwendung von Hybridisierungspuffer (10 % Dextransulfat Gew./Vol., 1 M NaCl, 1 % SDS, 100 mg Heringssperma-DNA) vorhybridisiert. Die Markierung der DNA-Sonde mit dem Highprime DNA labeling-Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) erfolgte während der Vorhybridisierung unter Verwendung von
45 alpha-³²P-dCTP (Amersham, Braunschweig, Deutschland). Die Hybridisierung wurde nach Zugabe der markierten DNA-Sonde im gleichen Puffer bei 68°C über Nacht durchgeführt. Die Wasch-

schrifte wurden zweimal für 15 min unter Verwendung von 2 X SSC und zweimal für 30 min unter Verwendung von 1 X SSC, 1 % SDS, bei 68°C durchgeführt. Die Exposition der verschlossenen Filter wurde bei -70°C für einen Zeitraum von 1 bis 14 T durchgeführt.

5

Zur Untersuchung des Vorliegens oder der relativen Menge an von dieser mRNA translatiertem Protein können Standardtechniken, wie ein Western-Blot, eingesetzt werden (siehe beispielsweise Ausubel et al. (1988) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley:

10 New York). Bei diesem Verfahren werden die zellulären Gesamt-Proteine extrahiert, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Matrix, wie Nitrozellulose, übertragen und mit einer Sonde, wie einem Antikörper, der spezifisch an das gewünschte Protein bindet, inkubiert. Diese Sonde ist gewöhnlich mit einer 15 chemilumineszenten oder kolorimetrischen Markierung versehen, die sich leicht nachweisen lässt. Das Vorliegen und die Menge der beobachteten Markierung zeigt das Vorliegen und die Menge des gewünschten, in der Zelle vorliegenden mutierten Proteins an.

20 Beispiel 15: Analyse der Auswirkung der rekombinanten Proteine auf die Produktion des gewünschten Produktes

Die Auswirkung der genetischen Modifikation in Pflanzen, Pilzen, Algen, Ciliaten oder auf die Produktion einer gewünschten Ver-
25 bindung (wie einer Fettsäure) kann bestimmt werden, indem die modifizierten Mikroorganismen oder die modifizierte Pflanze unter geeigneten Bedingungen (wie den vorstehend beschriebenen) gezüchtet werden und das Medium und/oder die zellulären Kompo-
nenten auf die erhöhte Produktion des gewünschten Produktes (d.h.
30 von Lipiden oder einer Fettsäure) untersucht wird. Diese Analyse-techniken sind dem Fachmann bekannt und umfassen Spektroskopie, Dünnschichtchromatographie, Färbeverfahren verschiedener Art, enzymatische und mikrobiologische Verfahren sowie analytische Chromatographie, wie Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
35 (siehe beispielsweise Ullman, Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 89-90 und S. 443-613, VCH: Weinheim (1985); Fallon, A., et al., (1987) "Applications of HPLC in Biochemistry" in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17; Rehm et al. (1993) Biotechnology, Bd. 3, Kapitel III:
40 "Product recovery and purification", S. 469-714, VCH: Weinheim; Belter, P.A., et al. (1988) Bioseparations: downstream processing for Biotechnology, John Wiley and Sons; Kennedy, J.F., und Cabral, J.M.S. (1992) Recovery processes for biological Materi-
als, John Wiley and Sons; Shaeiwitz, J.A., und Henry, J.D. (1988)
45 Biochemical Separations, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. B3; Kapitel 11, S. 1-27, VCH: Weinheim; und

Dechow, F.J. "(1989) Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications).

Neben den oben erwähnten Verfahren werden Pflanzenlipide aus
5 Pflanzenmaterial wie von Cahoon et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (22):12935-12940, und Browse et al. (1986) Analytic Biochemistry 152:141-145, beschrieben extrahiert. Die qualitative und quantitative Lipid- oder Fettsäureanalyse ist beschrieben bei Christie, William W., Advances in Lipid Methodology, Ayr/
10 Scotland: Oily Press (Oily Press Lipid Library; 2); Christie, William W., Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide - Ayr, Scotland: Oily Press, 1989, Repr. 1992, IX, 307 S. (Oily Press Lipid Library; 1); "Progress in Lipid Research, Oxford: Pergamon Press, 1 (1952) - 16 (1977) u.d.T.: Progress in the
15 Chemistry of Fats and Other Lipids CODEN.

Zusätzlich zur Messung des Endproduktes der Fermentation ist es auch möglich, andere Komponenten der Stoffwechselwege zu analysieren, die zur Produktion der gewünschten Verbindung ver-
20 wendet werden, wie Zwischen- und Nebenprodukte, um die Gesamt- effizienz der Produktion der Verbindung zu bestimmen. Die Analyseverfahren umfassen Messungen der Nährstoffmengen im Medium (z.B. Zucker, Kohlenwasserstoffe, Stickstoffquellen, Phosphat und andere Ionen), Messungen der Biomassezusammensetzung und
25 des Wachstums, Analyse der Produktion üblicher Metabolite von Biosynthesewegen und Messungen von Gasen, die während der Fermentation erzeugt werden. Standardverfahren für diese Messungen sind in Applied Microbial Physiology; A Practical Approach, P.M. Rhodes und P.F. Stanbury, Hrsgb., IRL Press,
30 S. 131-163 und 165-192 (ISBN: 0199635773) und darin angegebenen Literaturstellen beschrieben.

Ein Beispiel ist die Analyse von Fettsäuren (Abkürzungen: FAME, Fettsäuremethylester; GC-MS, Gas-Flüssigkeitschromatographie-
35 Massenspektrometrie; TAG, Triacylglycerin; TLC, Dünnschicht- chromatographie).

Der unzweideutige Nachweis für das Vorliegen von Fettsäure- produkten kann mittels Analyse rekombinanter Organismen nach
40 Standard-Analyseverfahren erhalten werden: GC, GC-MS oder TLC, wie verschiedentlich beschrieben von Christie und den Literatur- stellen darin (1997, in: Advances on Lipid Methodology, Vierte Aufl.: Christie, Oily Press, Dundee, 119-169; 1998, Gaschromato- graphie-Massenspektrometrie-Verfahren, Lipide 33:343-353).

88

Das zu analysierende Material kann durch Ultraschallbehandlung, Mahlen in der Glasmühle, flüssigen Stickstoff und Mahlen oder über andere anwendbare Verfahren aufgebrochen werden. Das Material muss nach dem Aufbrechen zentrifugiert werden. Das

5 Sediment wird in Aqua dest. resuspendiert, 10 min bei 100°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und erneut zentrifugiert, gefolgt von Extraktion in 0,5 M Schwefelsäure in Methanol mit 2 % Dimethoxypropan für 1 Std. bei 90°C, was zu hydrolysierten Öl- und Lipidverbindungen führt, die transmethylierte Lipide ergeben. Diese

10 Fettsäuremethylester werden in Petrolether extrahiert und schließlich einer GC-Analyse unter Verwendung einer Kapillarsäule (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 mikrom, 0,32 mm) bei einem Temperaturgradienten zwischen 170°C und 240°C für 20 min und 5 min bei 240°C unterworfen. Die Identität der erhaltenen

15 Fettsäuremethylester muss unter Verwendung von Standards, die aus kommerziellen Quellen erhältlich sind (d.h. Sigma), definiert werden.

Bei Fettsäuren, für die keine Standards verfügbar sind, muss die

20 Identität über Derivatisierung und anschließende GC-MS-Analyse gezeigt werden. Beispielsweise muss die Lokalisierung von Fettsäuren mit Dreifachbindung über GC-MS nach Derivatisierung mit 4,4-Dimethoxyoxazolin-Derivaten (Christie, 1998, siehe oben) gezeigt werden.

25

Beispiel 16: Expressionskonstrukte in heterologen mikrobiellen Systemen

Stämme, Wachstumsbedingungen und Plasmide

30

Der *Escherichia coli*-Stamm XL1 Blue MRF' kan (Stratagene) wird zur Subklonierung der neuen Elongasen wie PpPSE1 aus *Physcomitrella patens* verwendet. Für die funktionelle Expression dieses Gens verwenden wir den *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm

35 INVSc 1 (Invitrogen Co.). *E. coli* wird in Luria-Bertini-Brühe (LB, Duchefa, Haarlem, Niederlande) bei 37°C kultiviert. Wenn nötig, wird Ampicillin (100 mg/Liter) zugegeben, und 1,5 % Agar (Gew./Vol.) wird für feste LB-Medien hinzugefügt. *S. cerevisiae* wird bei 30°C entweder in YPG-Medium oder in komplettem Minimal-

40 medium ohne Uracil (CMdum; siehe in: Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Albright, L.B., Coen, D.M., und Varki, A. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York)

45 mit entweder 2 % (Gew./Vol.) Raffinose oder Glucose kultiviert. Für feste Medien werden 2 % (Gew./Vol.) Bacto™-Agar (Difco) hin-

zugefügt. Die zur Klonierung und Expression verwendeten Plasmide sind pUC18 (Pharmacia) und pYES2 (Invitrogen Co.).

5 Beispiel 17: Klonierung und Expression PUFA-spezifischer Elongasen aus Physcomitrella, Cryptothecodium und Thraustochytrium.

Die Vollängengene erfindungsgemäßer Sequenzen können wie in Beispiel 7 beschrieben isoliert und wie nachfolgend ausgeführt 10 weiter bearbeitet werden. Ausführungsweise werden konkrete Expressionsbeispiele dargestellt.

A) Elongation von Fettsäuren durch die Mooselongase Pp_PSE1:

15 Für die Expression in Hefe wurde der P. patens-cDNA-Klon PpPSE1 (früherer Datenbanksequenzname: 08_ck19_b07, neuer Name: pp001019019f), der das PUFA-spezifische Elongase- (PSE1-) Gen codiert, zuerst so modifiziert, daß eine BamHI-Restriktionsstelle und die Hefe-Konsensussequenz für hoch-effiziente Translation 20 (Kozak, M. (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes, Cell 44, 283-292) neben dem Startcodon und eine BamHI-Restriktionsstelle, die das Stopcodon flankierte, erhalten wurden. Zur Amplifikation des offenen Leserahmens wurde ein 25 Primerpaar, das komplementär zu dessen 5'- und 3'-Enden war, synthetisiert.

Das Gen erfindungsgemäßer Sequenz dargestellt in SEQ ID NO:1 wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion in pYES kloniert und 30 das Plasmid pYp_PSE1 erhalten:

Folgende Oligonukleotide wurden für das PCR-Experiment eingesetzt:

35 Ppex6: ggatcccacataatggaggtcggtggagagattc
Ppex6r: ggatcctcaactcagtttagctccctttgc

Die PCR-Reaktion wurde mit Plasmid-DNA des Klones PP001019019F als Matrize in einem Thermocycler (Biometra) mit der Pfu-DNA- 40 (Stratagene) Polymerase und dem folgenden Temperaturprogramm durchgeführt: 3 min bei 96°C, gefolgt von 25 Zyklen mit 30 s bei 96°C, 30 s bei 55°C und 1 min bei 72°C, 1 Zyklus mit 10 min bei 72°C.

45 Die korrekte Größe des amplifizierten DNA-Fragments wurde mittels Agarose-TBE-Gelelektrophorese bestätigt. Die amplifizierte DNA wurde aus dem Gel mit dem QIAquick-Gelextraktionskit (QIAGEN)

90

extrahiert und unter Verwendung des Sure Clone Ligation Kit (Pharmacia) zunächst in pUC18 kloniert. Das so klonierte Fragment wurde mit BamHI geschnitten, in pYES ligiert, wobei pYPP_PSE1 erhalten wurde. Die Fragmentorientierung wurde mittels HindIII 5 überprüft. Nach der Transformation von E. coli XL1 Blue MRF' kan wurde eine DNA-Minipräparation (Riggs, M.G., & McLachlan, A. (1986) A simplified screening procedure for large numbers of plasmid mini-preparation. BioTechniques 4, 310-313) von Transformanten durchgeführt, und positive Klone mittels BamHI-10 Restriktionsanalyse identifiziert. Die Sequenz des klonierten PCR-Produktes wurde mittels Resequenzierung unter Verwendung des ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt) bestätigt.

15 Ein Klon wurde für die DNA-Maxipräparation mit dem Nucleobond® AX 500 Plasmid-DNA-Extraktionskit (Macherey-Nagel, Düringen) angezogen.

Saccharomyces INVSc1 wurde mit pYPP_PSE1 bzw. mit pYES2 als 20 Kontrolle mittels eines modifizierten PEG/Lithiumacetat-Protokolls transformiert (Ausubel et al., 1995). Nach der Selektion auf CMdum-Agarplatten mit 2 % Glucose wurden Transformanten und eine pYES2-Transformante zur weiteren Anzucht und funktionellen Expression wie bereits ausgeführt 25 ausgewählt und mit verschiedenen Fettsäuren im Medium gefüttert.

i) Lipidmuster von Hefen, die mit dem pYES Plasmid ohne Fragmentinsertion transformiert sind oder das Pp-PSE1 Gen exprimieren (Angaben in mol%) nach Fütterung mit mit 30 250 mikrom Hexadekatriensäure (16:3^{Δ7c,10c,13c}).

Tabelle 4:

	PYES2	PYES2	pYPP_PSE1	pYPP_PSE1
35	16:0	11,8%	16:0	11,1%
	16:1	28,7%	16:1	23,9%
	16:3 ^{Δ7c,10c,13c}	9,2%	16:3 ^{Δ7c,10c,13c}	12,0%
	18:0	10,6%	18:0	8,6%
	18:1 ^{Δ9c}	34,9%	18:1 ^{Δ9c}	20,6%
40	18:1 ^{Δ11c}	1,1%	18:1 ^{Δ11c}	1,4%
	18:3 ^{Δ9c,12c,15c}	3,7%	18:3 ^{Δ9c,12c,15c}	21,4%

- ii) Lipidmuster von Hefen, die mit dem pYES Plasmid ohne Fragmentinsertion transformiert sind oder das Pp-PSE1 Gen exprimieren (Angaben in mol%) nach Fütterung mit 500 mikrom Pinolensäure (18:3^{Δ6c,9c,12c}).

5

Tabelle 5:

	PYES2	PYES2	pYPP_PSE1	PYPP_PSE1
10	16:0	18,3%	16:0	16,9%
	16:1 ^{Δ9c}	16,0%	16:1 ^{Δ9c}	15,3%
	18:0	8,6%	18:0	8,4%
	18:1 ^{Δ9c}	16,7%	18:1 ^{Δ9c}	17,5%
	18:1 ^{Δ11c}	0,7%	18:1 ^{Δ11c}	2,0%
	18:3 ^{Δ5c,9c,12c}	39,8%	18:3 ^{Δ5c,9c,12c}	32,6%
	20:3 ^{Δ7c,11c,14c}	0%	20:3 ^{Δ7c,11c,14c}	5,1%

15

- iii) Lipidmuster von Hefen, die mit dem pYES Plasmid ohne Fragmentinsertion transformiert sind oder das Pp-PSE1 Gen exprimieren (Angaben in mol%) nach Fütterung mit 500 mikrom Stearidonsäure (18:4^{Δ6c,9c,12c,15c}).

20

Tabelle 6:

	PYES2	pYES2	pYPP_PSE1	PYPP_PSE1
25	16:0	15,2%	16:0	15,6%
	16:1 ^{Δ9c}	13,1%	16:1 ^{Δ9c}	14,9%
	18:0	12,3%	18:0	10,7%
	18:1 ^{Δ9c}	12,9%	18:1 ^{Δ9c}	14,0%
	18:1 ^{Δ11c}	0,7%	18:1 ^{Δ11c}	1,2%
	18:3 ^{Δ6c,9c,12c,15c}	45,4%	18:3 ^{Δ6c,9c,12c,15c}	23,8%
	20:4 ^{Δ8c,11c,14c,17c}	0,4%	20:4 ^{Δ8c,11c,14c,17c}	19,8%

30

- iv) Lipidmuster von Hefen, die mit dem pYES Plasmid ohne Fragmentinsertion transformiert sind oder das Pp-PSE1 Gen exprimieren (Angaben in mol%) nach Fütterung mit 500 mikrom Linolsäure (18:2^{Δ9c,12c}).

Tabelle 7:

40

	PYES2	PYES2	pYPP_PSE1	PYPP_PSE1
45	16:0	7,9%	16:0	8,7%
	16:1 ^{Δ9c}	1,2%	16:1 ^{Δ9c}	1,3%
	18:0	5,3%	18:0	5,1%
	18:1 ^{Δ9c}	1,3%	18:1 ^{Δ9c}	1,3%
	18:2 ^{Δ9c,12c}	83,9%	18:2 ^{Δ9c,12c}	80,4%
	20:2 ^{Δ11c,14c}	0,5%	20:2 ^{Δ11c,14c}	3,2%

B) Elongation von Fettsäuren durch eine Elongase aus Thraustochytrium

Für die Expression in Hefe wird der Thraustochytrium-cDNA-
5 Klon aus SEQ ID NR: 3 (Tc_PSE2), der ein PUFA-spezifisches
Elongase-(PSE)-Gen codiert, zuerst so modifiziert, daß es ein
funktionell aktives Polypeptid darstellt. Zu diesem Zweck wird
der N-Terminus des Proteins auf DNA-Ebene durch die wenigen
fehlenden Basen aus der Physcomitrella patens Elongase um
10 42 Basenpaare verlängert. Es kann aber auch lediglich ein Start-
codon im passenden Leseraster zur Sequenz hinzugefügt werden.

Folgende Oligonukleotide werden für das PCR-Experiment ein-
gesetzt:

15

pTCPSE2-5':

aaaggatccacataatggaggcgtaggattctacggtagttggatggga
agGTCATTCGGGCCTCGACC

pTCPSE2-3': aaggatccctgagtttagctccctttgccttcc

20

Zusätzlich ist in beiden Oligonukleotiden eine BamHI-
Restriktionsstelle und die Hefe-Konsensussequenz für hoch-
effiziente Translation enthalten (Kozak, M. (1986) Point
mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon
25 that modulates translation by eukaryotic ribosomes, Cell 44,
283-292).

Die PCR-Reaktion wird mit Plasmid-DNA als Matrize in einem
Thermocycler (Biometra) mit der Pfu-DNA- (Stratagene) Polymerase
30 und dem folgenden Temperaturprogramm durchgeführt: 3 min bei 96°C,
gefolgt von 25 Zyklen mit 30 s bei 96°C, 30 s bei 55°C und 3 min
bei 72°C, 1 Zyklus mit 10 min bei 72°C und Stop bei 4°C.

Die korrekte Größe des amplifizierten DNA-Fragments wird
35 mittels Agarose-TBE-Gelelektrophorese bestätigt. Die ampli-
fizierte DNA wird aus dem Gel mit dem QIAquick-Gelextraktions-
kit (QIAGEN) extrahiert und in die SmaI-Restriktionsstelle des
dephosphorylierten Vektors pUC18 unter Verwendung des Sure
Clone Ligation Kit (Pharmacia) ligiert, wobei pUC-hybrid-Tc_PSE2
40 erhalten wird. Nach der Transformation von E. coli XL1 Blue MRF'
kan wurde eine DNA-Minipräparation (Riggs, M.G., & McLachlan,
A. (1986) A simplified screening procedure for large numbers
of plasmid mini-preparation. BioTechniques 4, 310-313) an
24 ampicillinresistenten Transformanten durchgeführt, und
45 positive Klone wurden mittels BamHI-Restriktionsanalyse
identifiziert. Die Sequenz des klonierten PCR-Produktes wurde
mittels Resequenzierung unter Verwendung des ABI PRISM Big Dye

Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt) bestätigt.

Die Plasmid-DNA von pUC-PSE1 sowie pUC- hybrid-Tc_PSE2 wurden 5 zudem mit BamHI gespalten und die erhaltene Fragmente wurden in die BamHI-Restriktionsstelle des dephosphorylierten Hefe-E. coli-Shuttlevektors pYES2 ligiert, wobei pY2 hybrid-Tc_PSE2 erhalten wird. Nach der Transformation von E. coli und DNA-Minipräparation aus den Transformanten wurde die Orientierung des DNA-Fragments 10 im Vektor durch HindIII-Spaltung überprüft. Ein Klon wurde jeweils für die DNA-Maxipräparation mit dem Nucleobond® AX 500 Plasmid-DNA-Extraktionskit (Macherey-Nagel, Düringen) angezogen. Saccharomyces INVSc1 wird mit pY2PSE1, pYES2, pY2-hybrid-Tc_PSE2 und pYES2 mittels eines modifizierten PEG/Lithiumacetat- 15 Protokolls transformiert (Ausubel et al., 1995). Nach der Selektion auf CMdum-Agarplatten mit 2 % Glucose werden je vier pY2PSE1-Transformanten (pY2PSE1a-d), pY2-hybrid-Tc_PSE2 -Transformanten (pY2-hybrid-Tc_PSE2 1a-d) und eine pYES2-Transformante zur weiteren Anzucht und funktionellen Expression ausgewählt.

20

Funktionelle Expression einer Elongaseaktivität in Hefe

Vorkultur:

25 20 ml CMdum-Flüssigmedium mit 2 % (Gew./Vol.) Raffinose wurden mit den transgenen Hefeklonen (pY2- hybrid-Tc_PSE2 1a-d, pYES2) angeimpft und 3 T bei 30°C, 200 rpm gezüchtet, bis eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 1,5-2 erreicht wurde.

30 Hauptkultur:

Für die Expression wurden 20 ml CMdum-Flüssigmedium mit 2 % Raffinose und 1 % (Vol./Vol.) Tergitol NP-40 mit Fettsäuresubstraten auf eine Endkonzentration von 0,003 % (Gew./Vol.) 35 angereichert. Die Medien werden mit den Vorkulturen auf eine OD_{600} von 0,05 angeimpft. Die Expression wurde bei einer OD_{600} von 0,2 mit 2 % (Gew./Vol.) Galaktose für 16 Std. induziert, wonach die Kulturen eine OD_{600} von 0,8-1,2 geerntet wurden.

40 Fettsäureanalyse:

Die Gesamt-Fettsäuren wurden aus Hefekulturen extrahiert und mittels Gaschromatographie analysiert. Davon wurden Zellen von 5 ml Kultur mittels Zentrifugation (1000 x g, 10 min, 4 °C) 45 geerntet und einmal mit 100 mM NaHCO₃, pH 8,0, gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Zur Herstellung des Fettsäuremethylester (FAMES) wurden die Zellsedimente mit

1 M methanolischer H₂SO₄ und 2-% (Vol./Vol.) Dimethoxypropan für 1 Std. bei 80°C behandelt. Die FAMES wurden zweimal mit 2 ml Petrolether extrahiert, einmal mit 100 mM NaHCO₃, pH 8,0, und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet.

5 Das organische Lösungsmittel wurde unter einem Argonstrom verdampft, und die FAMES wurden in 50 mikrol Petrolether gelöst. Die Proben wurden auf einer ZEBRON-ZB-Wax-Kapillarsäule (30 m, 0,32 mm, 0,25 mikro m; Phenomenex) in einem Hewlett Packard-6850-Gaschromatograph mit einem Flammenionisationsdetektor aufgetrennt. Die Ofentemperatur wurde von 70°C (1 min halten) bis 200°C mit einer Rate von 20°C/min, dann auf 250°C (5 min halten) mit einer Rate von 5°C/min und schließlich auf 260°C mit einer Rate von 5°C/min programmiert. Stickstoff wurde als Trägergas verwendet (4,5 ml/min bei 70°C). Die Fettsäuren wurden durch 10 verglichen mit Retentionszeiten von FAME-Standards (SIGMA) identifiziert.

15

Die Fettsäuremuster von fünf transgenen Hefestämmen in Mol.-% sind in Tabelle 1 gezeigt.

20 Die Verhältnisse der zugegebenen und aufgenommenen g-Linolensäure sind durch fettgedruckte Zahlen hervorgehoben, die der elongierten Produkte durch rote Zahlen und die der elongierten g-Linolensäure durch fettgefrückte Zahlen (letzte Zeile).

25

Die GC-Analyse von FAMES, die aus Gesamt-Lipiden der mit pYES2 (i/Kontrolle) und pY2PSE1 (ii-iv c+d/ jeweils transformiert mit pY2PSE1A, pY2PSE1B, pY2PSE1C, pY2PSE1D) transformierten Hefen ist in Figur 2a-e gezeigt. Für die Analyse wurden die transgenen 30 Hefen in Anwesenheit von g-18:3 gezüchtet. Die Tab. 1 zeigt ihre Fettsäuremuster in Mol.-%. Die Aufnahme von g-18:3 ist durch fettgedruckte Zahlen hervorgehoben, das Elongationsprodukt Dihomo-g-linolensäure (20:3D8,11,14) ist unterstrichen und das Verhältnis g-18:3-Elongationsprodukt (ebenfalls in Mol.-%) 35 durch fettgedruckte Zahlen (letzte Zeile). Die Struktur und die Massenspektren des DMOX-Derivates von cis-D6,9,12 C18:3 sind aus Fig. 3a+b ersichtlich. Die Struktur und die Massenspektren des DMOX-Derivates von D8,11,14 C20:3 sind aus Fig. 4a+b ersichtlich.

40 Die Ergebnisse zeigen, daß g-18:3 in großen Mengen in alle transgenen Hefen eingebaut worden ist. Alle vier transgenen Hefeklone, die mit pY2PSE1 transformiert wurden, zeigen einen zusätzlichen Peak im Gaschromatogramm, der durch Vergleich der Retentionszeiten als 20:3 D8,11,14 identifiziert wurde. Eine Gaschromatographie/Massenspektroskopie kann zusätzliche Unterstützung zur Bestätigung dieser Identität liefern. Der Anteil an elongierter 45 g-18:3 betrug, wie in Tabelle 1 gezeigt, 23,7 bis 40,5 %. Ferner

konnte keine signifikante Elongation von Palmitinsäure (16:0), Palmitoleinsäure (16:1), Stearinsäure (18:0) oder Ölsäure (18:1 D9) beobachtet werden.

5 Die identifizierten Produkte zeigen, daß die Nukleotidsequenz von PpPSE1 eine D6-selektive Fettsäure-Elongase aus dem Moos *Physcomitrella patens* codiert, die zur Bildung neuer Fettsäuren in transgenen Hefen führt.

10 Die Verhältnisse der zugegebenen und aufgenommenen Fettsäure-substrate können wie vorstehend ermittelt werden und so Quantität und Qualität der Elongasereaktion erfaßt werden.

Die Struktur und die Massenspektren von DMOX-Derivaten ergeben
15 auch die jeweilige Position einer Doppelbindung.

Weitere Fütterungsexperimente mit verschiedenen anderen Fettsäuren (z.B. Arachidonsäure, Eicosapentaensäure etc.) können zur detaillierteren Bestätigung der Substratselektivität dieser
20 Elongase durchgeführt werden.

Beispiel 18: Reinigung des gewünschten Produktes aus transformierten Organismen allgemein

25 Die Gewinnung des gewünschten Produktes aus Pflanzenmaterial oder Pilzen, Algen, Ciliaten, tierischen Zellen oder aus dem Überstand der vorstehend beschriebenen Kulturen kann durch verschiedene, im Fachgebiet bekannte Verfahren erfolgen. Wird das gewünschte Produkt nicht aus den Zellen sezerniert, können die Zellen aus
30 der Kultur durch langsame Zentrifugation geerntet werden, die Zellen können durch Standardtechniken, wie mechanische Kraft oder Ultraschallbehandlung, lysiert werden. Organe von Pflanzen können mechanisch von anderem Gewebe oder anderen Organen getrennt werden. Nach der Homogenisation werden die Zelltrümmer durch
35 Zentrifugation entfernt, und die Überstandsfraktion, welche die löslichen Proteine enthält, wird zur weiteren Reinigung der gewünschten Verbindung aufbewahrt. Wird das Produkt aus gewünschten Zellen sezerniert, werden die Zellen durch langsame Zentrifugation aus der Kultur entfernt, und die Überstands-
40 fraktion wird zur weiteren Reinigung aufbewahrt.

Die Überstandsfraktion aus jedem Reinigungsverfahren wird einer Chromatographie mit einem geeigneten Harz unterworfen, wobei das gewünschte Molekül entweder auf dem Chromatographieharz zurück-
45 gehalten wird, viele Verunreinigungen in der Probe jedoch nicht, oder die Verunreinigungen auf dem Harz zurückbleiben, die Probe hingegen nicht. Diese Chromatographieschritte können wenn nötig

96

wiederholt werden, wobei die gleichen oder andere Chromatographieharze verwendet werden. Der Fachmann ist in der Auswahl geeigneter Chromatographieharze und ihrer wirksamsten Anwendung für ein bestimmtes zu reinigendes Molekül bewandert. Das 5 gereinigte Produkt kann durch Filtration oder Ultrafiltration konzentriert und bei einer Temperatur aufbewahrt werden, bei der die Stabilität des Produktes maximal ist.

Im Fachgebiet ist ein breites Spektrum an Reinigungsverfahren 10 bekannt, und das vorstehende Reinigungsverfahren soll nicht beschränkend sein. Diese Reinigungsverfahren sind zum Beispiel beschrieben in Bailey, J.E., & Ollis, D.F., Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill: New York (1986).

15 Die Identität und Reinheit der isolierten Verbindungen kann durch Standardtechniken des Fachgebiets bestimmt werden. Dazu gehören Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), spektroskopische Verfahren, Färbeverfahren, Dünnschichtchromatographie, NIRS, Enzymtest oder mikrobiologisch. Eine Übersicht 20 über diese Analyseverfahren siehe in: Patek et al. (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60:133-140; Malakhova et al. (1996) Biotekhnologiya 11:27-32; und Schmidt et al. (1998) Bioprocess Engineer. 19:67-70. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1996) Bd. A27, VCH: Weinheim, S. 89-90, S. 521-540, S. 540-547, 25 S. 559-566, 575-581 und S. 581-587; Michal, G (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley and Sons; Fallon, A., et al. (1987) Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17.

30 Äquivalente

Der Fachmann erkennt oder kann viele Äquivalente der hier beschriebenen erfindungsgemäßen spezifischen Ausführungsformen 35 feststellen, indem er lediglich Routineexperimente verwendet. Diese Äquivalente sollen von den Patentansprüchen umfaßt sein.

40

45

Patentansprüche

1. Isolierte Nukleinsäure, die von einer Pflanze oder Alge
5 stammt und ein Polypeptid codiert, das C₁₆-, C₁₈- oder C₂₀-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängert.
2. Isolierte Nukleinsäure, umfassend eine Nukleotidsequenz,
10 die ein Polypeptid codiert, das C₁₆-, C₁₈- oder C₂₀-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül verlängert, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus
15 a) einer in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 oder SEQ ID NO:7 dargestellten Nukleinsäuresequenz,
b) einer Nukleinsäuresequenz, die gemäß dem degenerierten genetischen Code von der in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 oder SEQ ID NO:7 dargestellten Sequenz
20 stammt,
c) Derivate der in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 oder SEQ ID NO:7 dargestellten Sequenz, die für Polypeptide der in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 oder SEQ ID NO:8 dargestellten Aminosäuresequenz codieren und mindestens 50% Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist.
25
- 30 3. Isolierte Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 2, wobei die Sequenz von einer Pflanze, Alge oder Pilz stammt.
4. Isolierte Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 2 oder Anspruch 3, wobei die Sequenz von Physcomitrella, Thraustochytrium oder Crythecodinium stammt.
35
5. Genkonstrukt, umfassend eine isolierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Nukleinsäure funktionell mit einem oder mehreren Regulationssignalen verbunden ist.
40
6. Genkonstrukt nach Anspruch 5, dessen Genexpression durch die Regulationssignale verstärkt wird.

7. Genkonstrukt enthalten eine Nukleinsäuresequenz nach den Ansprüchen 1 bis 4 oder ein Genkonstrukt nach Anspruch 5 oder 6 und mindestens eine weitere Nukleinsäure, die für ein Gen der Fettsäurebiosynthese codiert.
5
8. Genkonstrukt nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure, die für ein Gen der Fettsäurebiosynthese codiert ausgewählt aus der Gruppe Δ19-, Δ17-, Δ15-, Δ12-, Δ9-, Δ8-, Δ6-, Δ5-, Δ4-Desaturase, die verschiedenen
10 Hydroxylasen, die Δ12-Acetylenase, die Acyl-ACP-Thioesterasen, β-Ketoacyl-ACP-Synthasen oder β-Ketoacyl-ACP-Reductasen ist.
9. Aminosäuresequenz, die durch die isolierte Nukleinsäuresequenz nach den Ansprüchen 1 bis 4 oder das Genkonstrukt nach einem der Ansprüche 5 bis 8 codiert wird.
15
10. Vektor, umfassend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder ein Genkonstrukt nach einem der Ansprüche 5 bis 8.
20
11. Organismus, umfassend mindestens eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 4, ein Genkonstrukt nach einem der Ansprüche 5 bis 8 oder einen Vektor nach Anspruch 10.
25
12. Organismus nach Anspruch 11, wobei der Organismus ein Mikroorganismus, ein Tier oder eine Pflanze ist.
30
13. Organismus nach Anspruch 11 oder 12, wobei der Organismus eine transgene Pflanze ist.
35
14. Antikörper, der spezifisch ein Polypeptid, das von einer der Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1 bis 4 codiert wird, bindet.
15. Antisense-Nukleinsäuremolekül, das die Komplementärsequenz der Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 4 umfasst.
40
16. Verfahren zur Herstellung von PUFAs, wobei das Verfahren das Züchten eines Organismus umfaßt, der eine Nukleinsäure nach Anspruch 1, ein Genkonstrukt nach Anspruch 6 oder einen Vektor nach Anspruch 10 umfaßt, codierend ein Polypeptid, das C₁₆-, C₁₈- oder C₂₀-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül um mindestens zwei Kohlenstoffatome unter Bedingungen verlängert, unter denen PUFAs in dem Organismus gebildet werden.
45

17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei die durch das Verfahren hergestellten PUFAs C₁₈-, C₂₀- oder C₂₂-Fettsäuremoleküle mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül sind.
- 5 18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, wobei die C₁₈-, C₂₀- oder C₂₂-Fettsäuremoleküle aus dem Organismus in Form eines Öls, Lipids oder einer freien Fettsäure isoliert werden.
- 10 19. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 18, wobei der Organismus ein Mikroorganismus, ein Tier oder eine Pflanze ist.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 19, wobei der Organismus eine transgene Pflanze ist.
- 15 21. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 20, wobei die C₁₆-, C₁₈- oder C₂₀-Fettsäure eine Fettsäure mit drei Doppelbindungen im Molekül ist.
- 20 22. Öl, Lipide oder Fettsäuren oder eine Fraktion davon, hergestellt durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 21.
- 25 23. Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung, die PUFAs enthalten und von transgenen Pflanzen stammen.
24. Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung nach Anspruch 23, wobei die PUFAs von transgenen Pflanzen stammen, welche eine Nukleotidsequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 4, das Genkonstrukt nach einem der Ansprüche 5 bis 8, das Antisense-Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 15 oder den Vektor nach Anspruch 10 umfassen.
- 35 25. Verwendung der Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung nach Anspruch 22 bis 24 in Futter, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika.
26. Zusammensetzung, umfassend den Antikörper nach Anspruch 14, das Antisense-Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 15 oder 40 einen Antagonisten oder Agonisten identifiziert nach Anspruch 28.
27. Kit, umfassend die Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 4, das Genkonstrukt nach einem der Ansprüche 5 bis 8, das Antisense-Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 15, den Antikörper nach Anspruch 14, einen Antagonisten oder 45 Agonisten identifiziert nach Anspruch 28, die Zusammen-

100

setzung nach Anspruch 26, die Aminosäuresequenz nach Anspruch 9 und/oder Öl, Lipide und/oder Fettsäuren oder eine Fraktion davon nach einem der Ansprüche 22 bis 25.

5 28. Verfahren zur Identifikation eines Antagonisten oder Agonisten von Elongasen, umfassend

- 10 a) in Kontaktbringen der Zellen, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung exprimieren, mit einem Kandidatenstoff;
- b) Testen der PSE-Aktivität;
- 15 c) Vergleichen der PSE-Aktivität mit einer Standardaktivität in Abwesenheit des Kandidatenstoffs, wobei ein Anstieg der PSE-Aktivität über den Standard anzeigt, daß der Kandidatenstoff ein Agonist und ein Verringerung der PSE-Aktivität anzeigt, daß der Kandidatenstoff ein Antagonist ist.

20

25

30

35

40

45

Fig. 1 Vergleich des Hefe elo1 Peptids (obere Reihe) mit
Physcomitrella patens PpPSE1

49	dfeftvvgkqplseprpvllfiamyyvvifggrslvk.....	sckplkl	91
	. : ... :: : . . .		
32	DTPTTKGLPLVDSPTPIVLGVSVYLTIVIGGLLWIKARDLKPRASEPFLL		81
	. .		
92	rfisqvhnmltsvsflwlilmvegmlpivyrglyfavcnveswtqpme		141
	. : .. : . : : : . . .		
82	QALVLVHNLFCFALSLYMCVGIAQ..AITWRYSLWGNAYNPKH..KEMA		127
	. .		
142	tlyylnymtkfvfadtvlmvlkh..rkltflhtyhggatallcy...nq		186
	. : : : : .		
128	ILVYLFYMSKYVEFMDTVIMILKRSTRQISFLHVYHHSSISLIWWAIAHH		177
	. .		
187	lvgytavtwvpvtlnlavhvlmywyylsa.....	sgirwwwkawvt	228
		
178	APGGEAY.W.SAALNSGVHVLMYAYYFLAACLRSSPKLKNKYLFWGRLT		225
	. .		
229	r1qivqfmldlivvyyvlyqkivaayfknactpqedclgsmtaiaagaa		278
 : :		
226	QFQMFQFMLNLVQAYYDM..KTNAPY.....PQ.....WLKILFY		259
	. .		
279	iltsylflfisfyievykrgsasgkkk	305	
	: . : : .		
260	YMISLLFLFGNFYVQKYIKPS.DGKQK		

| identische Aminosäure

./: chemisch äquivalent

NAE 2344/00

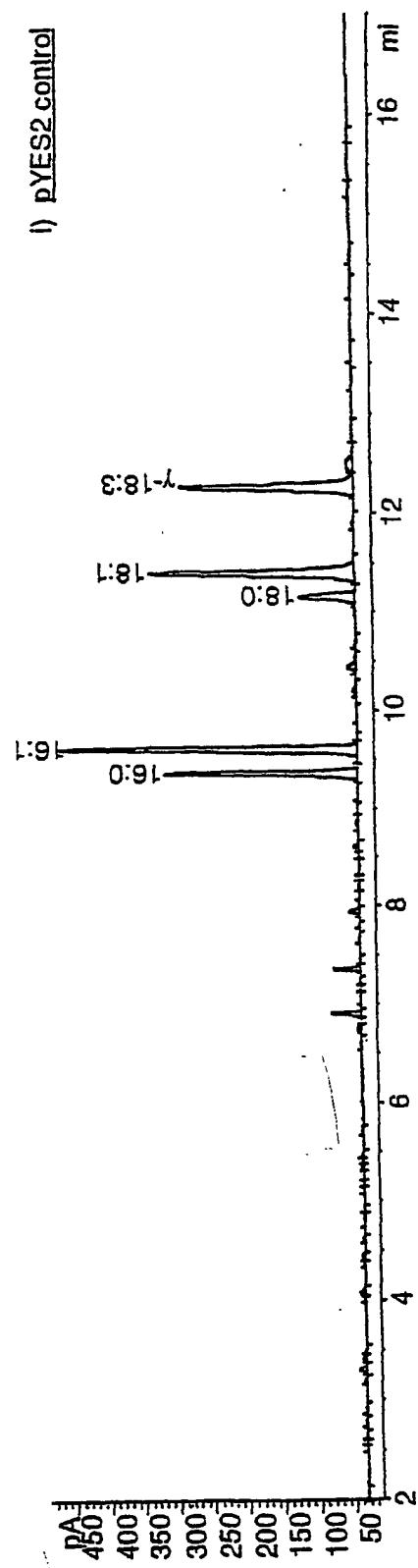


Figure 2a

Figure 2b

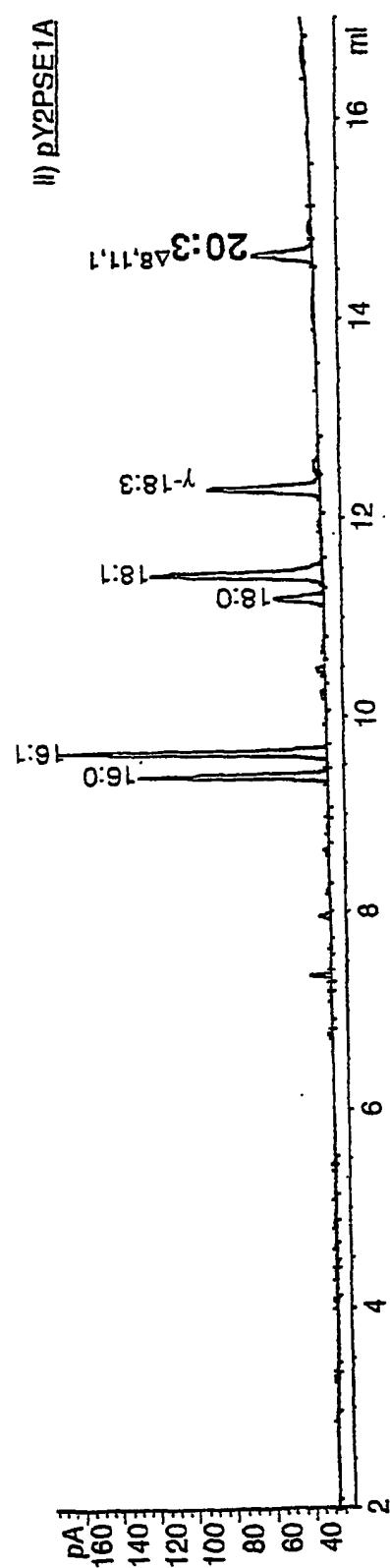


Figure 2c

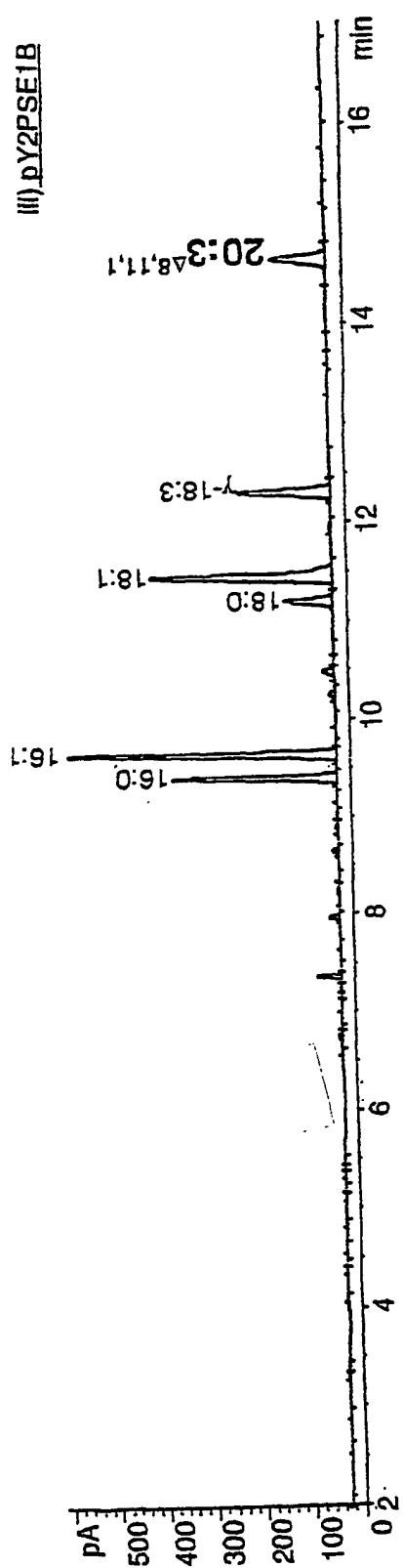


Figure 2d

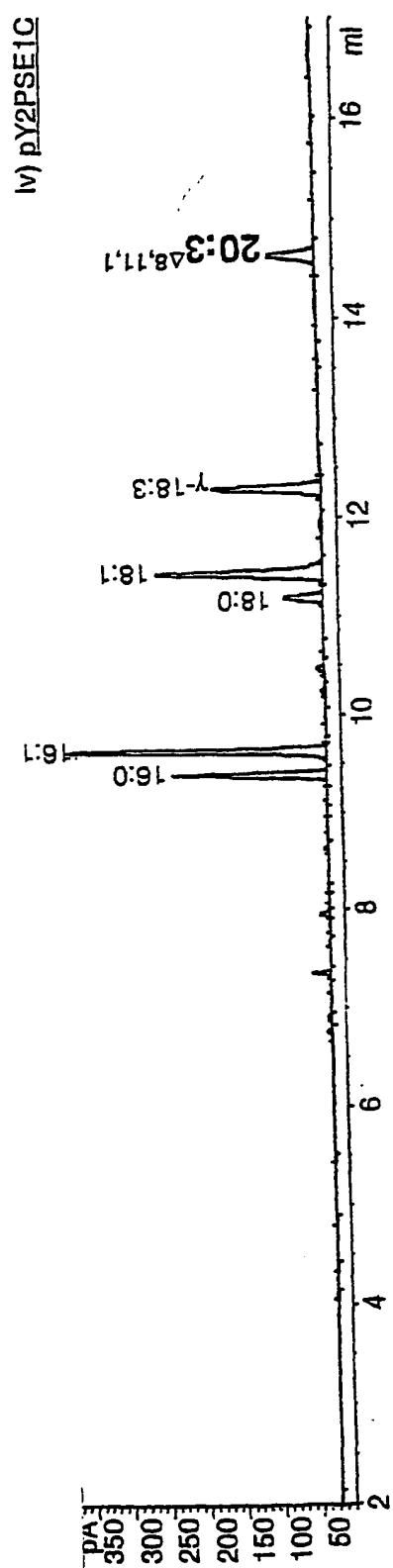


Figure 2e

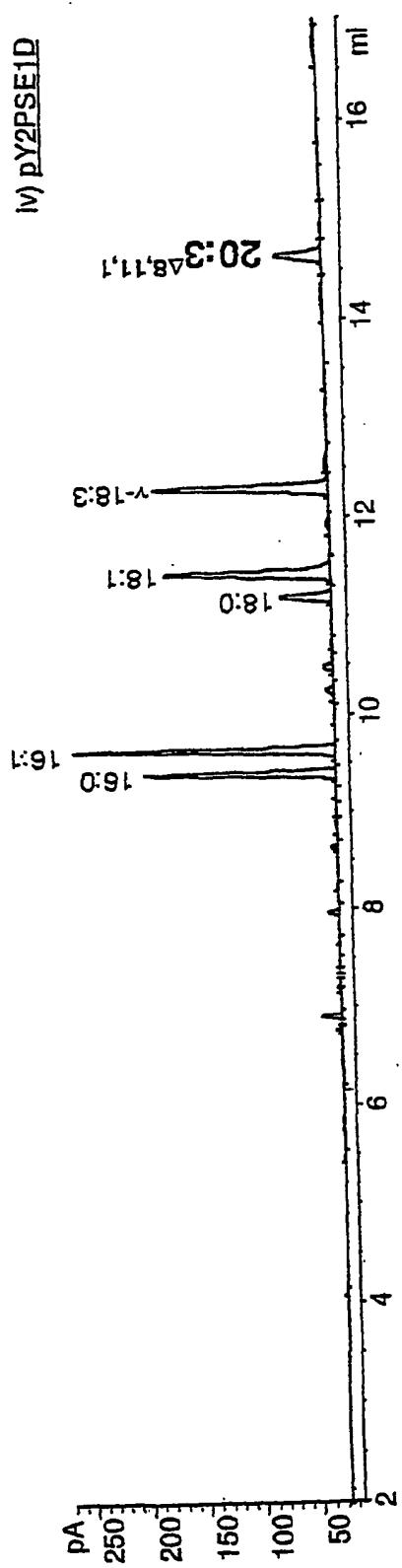


Fig. 3a: DMOX-Derivat von cis $\Delta^{6,9,12}$ 18:3

EI-MS des DMOX-Derivates
von cis $\Delta^{6,9,12}$ 18:3

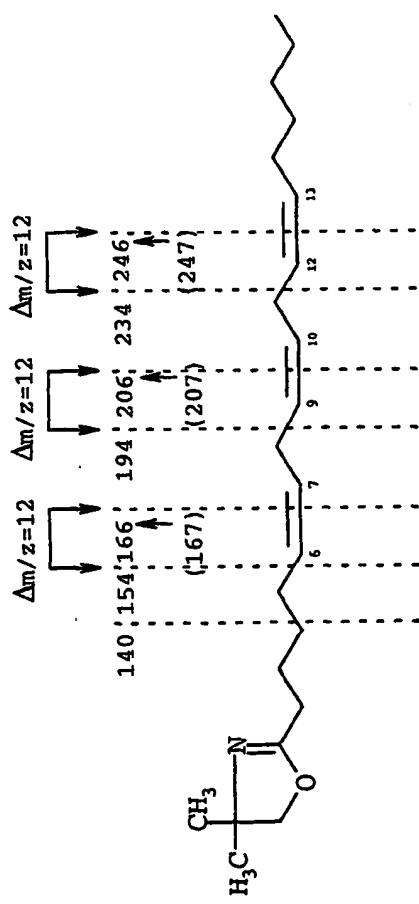


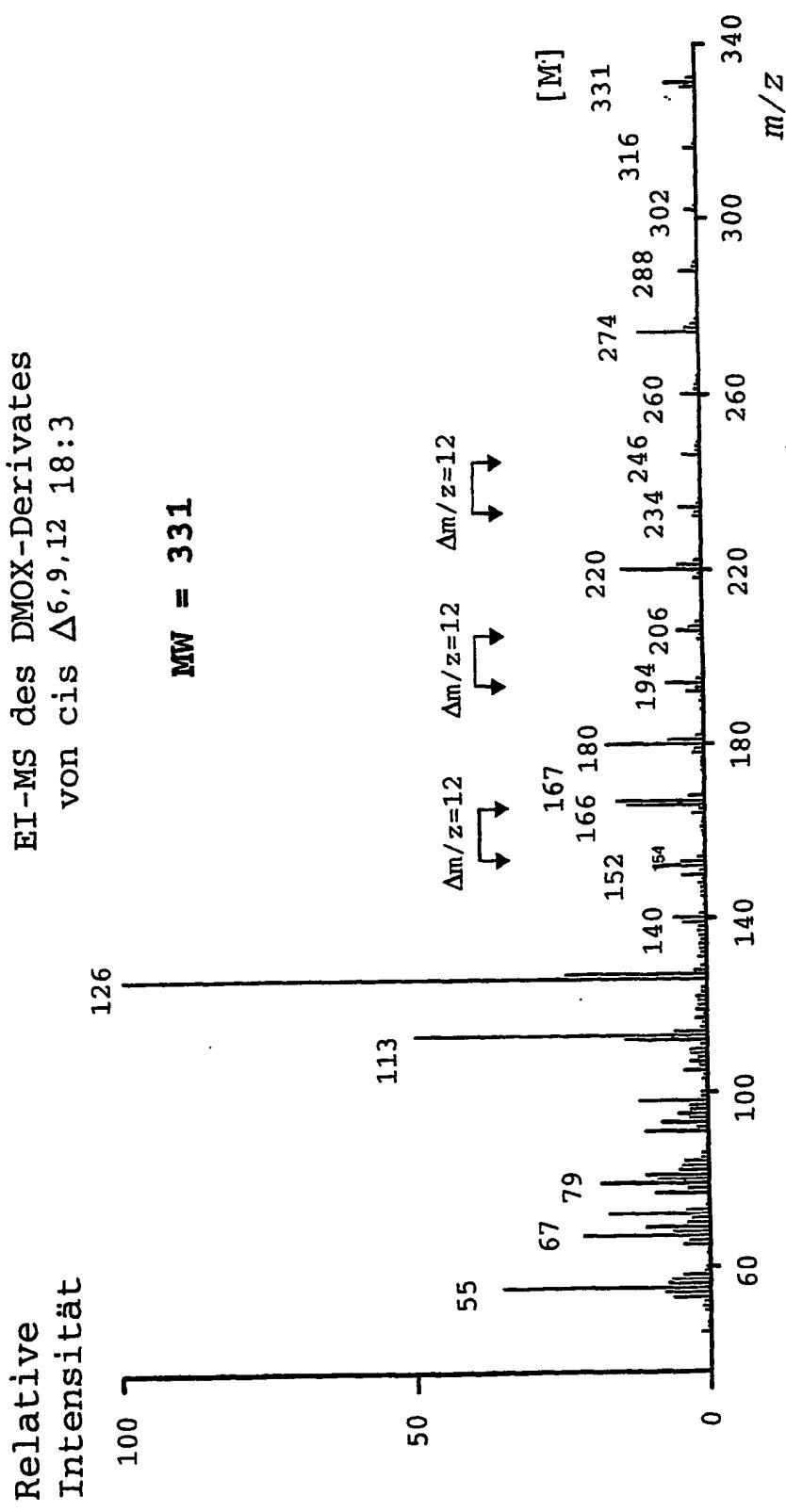
Fig. 3b: Massenspektrum des DMOX-Derivates von cis $\Delta^{6,9,12}$ 18:3

Fig. 4a: DMOX-Derivat von cis $\Delta^{8,11,14} 20:3$

EI-MS des DMOX-Derivates
von cis $\Delta^{8,11,14} 20:3$

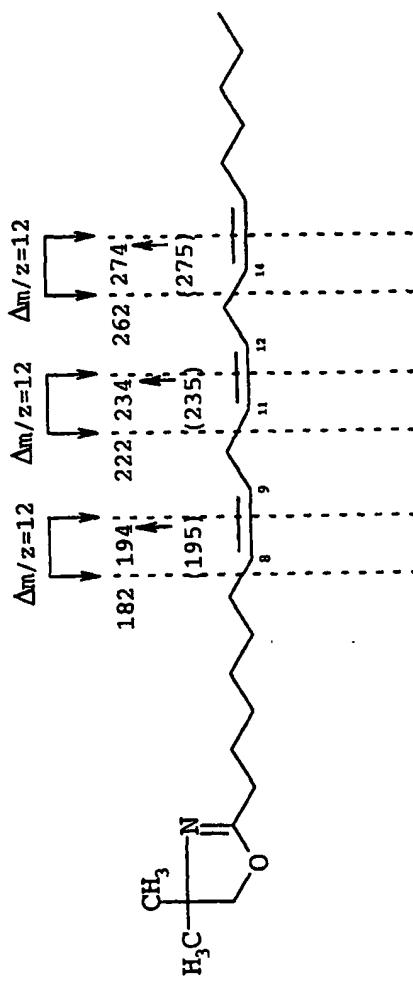


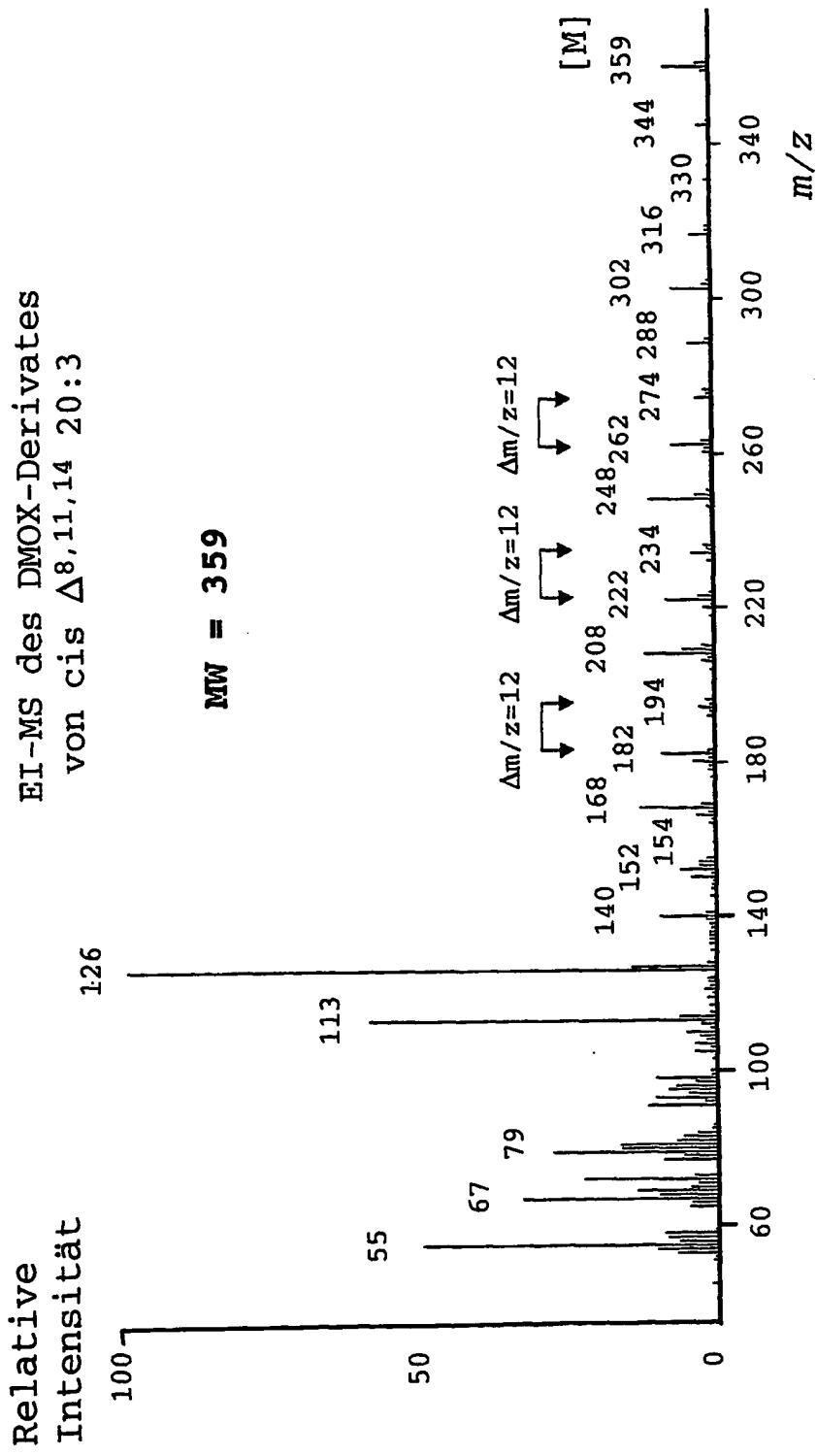
Fig. 4b: Massenspektrum des DMOX-Derivates von cis $\Delta^{8,11,14}$ 20:3

Fig. 5:

Pp_PSE1: KHKEMAILVYLFYMSKYVEFMDTIVIMILKSTRQISFLHVYHHSSISLIWIAAHAPGC
 KH ++ LF +SK E+ DTV++I+K + ++ FLHV HH++ W H
 Tc_PSE1: KHPHEQLISLLFALKSIIWEDTIVILLIVKGN--KLRFHVHATT--FWLYAIDHIFLS

Pp_PSE1: EAWWSAALNSGVHVLMYAYYFLAACLRSSPKLNKYLFWGRYLTFQFMFQFMLNL-----
 + A+N+ +H +MYA+YF R PK + TQ Q+ QF+ ++
 Tc_PSE1: SIKYGAVANNAFIHTVMYAHYF----RDPFPGLRPLI-----TQLQIVQFIRSIGHTA

Pp_PSE1: VQAYYDMKTNAPYPOMLIKILFYYMISLLFLFGNFYVQKYI
 + +YD + W + +++ L LF NFY+Q+Y+
 Tc_PSE1: IYWHYDCEPLVHTHFWEYVTPLYFVVPLFLILFLNFYLQQYV

Fig. 6:

PP_PSE1:	LNSGVHVLMYAYYFLAA
	+N+VH +MYAYY A
Tc_PSE2:	INASVHAIMMYAYAFTA

Fig. 7:

Pp_PSE1:
ALLVLFYMSKYVEFMDTVIMILKRSTRQ1SFLHVYHSSISLIWW-AIA-HHAPGGFAY
A+ + LF SK E MDTV +ILK +++ FL YHH++ + L W A+A + PG
ALALCLFCFSKIPELMDTVFLILKG--KKVRFQLQWYHATVMLFCWLALATEYTPG---L

Cc_PSE1:

Pp_PSE1:
WSAAALNSGVHVLMYAYFL 203
W AA N VH +MY Y+FL

Cc_PSE1:
WFAATTNYFVHSIMMYYFFL 339

Fig. 8 Vergleich der Polypeptidsequenz PpPSE1 mit Tc_PSE2

Pp_PSE1: 1 MEVVERFYGELDGKVSQGVNAL.LGSFGVELTDTPTTKGLPLVDSPTPIV 49
 | | .. | . | . || . . |

Tc_PSE2: 1VISGLDLLPVLSWETMKFDTAEVVSVWLRTHMWVPF 36

50 LGVSVYLTIVIGGLLWIKAR...DL.KPRASEPFLLQALVLVHNLCFAL 95

| :|| :: | ... | || || | . | . . . :

37 LMCFIYLVVIFGIQYYMEDRKEFDLRKPLAA....WSAFLAIFSIGASIR 82

96 SLYMCVGIAYQAITWRYSLWGNAYNP..KHKEMAILVYLFYMSKYVEFMD 143

..... |: | : | | . | : | || | . | . . . |

83 TVPVLLKMLYEKGT.HHVLCGDTRNDWVIDNPAGVWTMAFIFSKIPELID 131

144 TVIMILKRSTRQISFLHVYHHSSISLI.WWAIAHHAPGEAYWSAALNSG 192

| . . . |:: |.: | | || | . : | | | | . | : | | : |

132 TLFIVLRK..RKLITLHWYHHVTULLFCWHAWATFALTGIVF..AAINAS 177

193 VHVLMYAYYFLAACLRSSPKLKNKYLFWGRYLTQFQMFQFMLNLVQAY.. 240

|| :||||| | | | | | | :| | . | .. . :

178 VHAIMYAYYAFTA.LGYRP...TSYAI...YITLIQIMQMVGTVAVTFYI 220

241 .YDMKTNAPYP.....QW..LIK.....ILFYYMI..S 263

||| | | | | | | | | | :| .. |

221 GYDMAFVTPQPFRLDMKLNWDPLSKGENTEPTCKGANSSNAIFGVIMYAS 270

264 LLFLFGNFYVQKYIKPSDGKQKGAKTE. 290

|:|| |: |::| | |

271 YLYLFCLFFYMAYLRPKKSTPAAKTN. 297

| identische Aminosäure

./: chemisch äquivalent

Figur 9: Vergleich der Polypeptidsequenz CC_PSE1 mit Tc_PSE2

| identische Aminosäure
./: chemisch äquivalent

Fig. 10

	Motiv 1	Motiv 2	Motiv 3	Motiv 4
Pp_PSE1		FLHVYHH	LMYAYYF	FGNFYVQ
Tc_PSE1		FLHVLHH	LMYAHYF	FLNFYLQ
Tc_PSE2	FSKIPEL	TLHWYHH	IMYAYFF	
Cc_PSE1	FSKIPEL	FLQWYHH	IMYMYFF	

Consensus:	FSKIPEL	FLHWYHH	LMYAYYF	FGNFYVQ
Variation:		T QVL	I MHF	L L

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> New Elongase gene and a process for the production of polyunsaturated fatty acids

<130> 0050/51159

<140> 200000081

<141> 2000-02-09

<160> 12

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 1192

<212> DNA

<213> Physcomitrella patens

<220>

<221> CDS

<222> (58) .. (930)

<400> 1

ctgcttcgtc tcatcttggg ggtgtgattc gggagtgggt tgagttggtg gagcgca 57

atg gag gtc gtg gag aga ttc tac ggt gag ttg gat ggg aag gtc tcg 105
Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu Leu Asp Gly Lys Val Ser
1 5 10 15

cag ggc gtg aat gca ttg ctg ggt agt ttt ggg gtg gag ttg acg gat 153
Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Asp
20 25 30

acg ccc act acc aaa ggc ttg ccc ctc gtt gac agt ccc aca ccc atc 201
Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val Asp Ser Pro Thr Pro Ile
35 40 45

gtc ctc ggt gtt tct gta tac ttg act att gtc att gga ggg ctt ttg 249
Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile Val Ile Gly Gly Leu Leu
50 55 60

tgg ata aag gcc agg gat ctg aaa ccg cgc gcc tcg gag cca ttt ttg 297
Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg Ala Ser Glu Pro Phe Leu
65 70 75 80

ctc caa gct ttg gtg ctt gtg cac aac ctg ttc tgt ttt gcg ctc agt 345
 Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu Phe Cys Phe Ala Leu Ser
 85 90 95

ctg tat atg tgc gtg ggc atc gct tat cag gct att acc tgg cgg tac 393
 Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln Ala Ile Thr Trp Arg Tyr
 100 105 110

tct ctc tgg ggc aat gca tac aat cct aaa cat aaa gag atg gcg att 441
 Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys His Lys Glu Met Ala Ile
 115 120 125

ctg gta tac ttg ttc tac atg tct aag tac gtg gaa ttc atg gat acc 489
 Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr Val Glu Phe Met Asp Thr
 130 135 140

gtt atc atg ata ctg aag cgc agc acc aggcaa ata agc ttc ctc cac 537
 Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg Gln Ile Ser Phe Leu His
 145 150 155 160

gtt tat cat cat tct tca att tcc ctc att tgg tgg gct att gct cat 585
 Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile Trp Trp Ala Ile Ala His
 165 170 175

cac gct cct ggc ggt gaa gca tat tgg tct gcg gct ctg aac tca gga 633
 His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser Ala Ala Leu Asn Ser Gly
 180 185 190

gtg cat gtt ctc atg tat gcg tat tac ttc ttg gct gcc tgc ctt cga 681
 Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe Leu Ala Ala Cys Leu Arg
 195 200 205

agt agc cca aag tta aaa aat aag tac ctt ttt tgg ggc agg tac ttg 729
 Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu Phe Trp Gly Arg Tyr Leu
 210 215 220

aca caa ttc caa atg ttc cag ttt atg ctg aac tta gtg cag gct tac 777
 Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu Asn Leu Val Gln Ala Tyr
 225 230 235 240

tac gac atg aaa acg aat gcg cca tat cca caa tgg ctg atc aag att 825
 Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys Ile
 245 250 255

ttg ttc tac tac atg atc tcg ttg ctg ttt ctt ttc ggc aat ttt tac 873
 Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe Tyr
 260 265 270

gta caa aaa tac atc aaa ccc tct gac gga aag caa aag gga gct aaa 921
 Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys
 275 280 285

act gag tga gctgtatcaa gccatagaaa ctctattatg ttagaacctg 970
 Thr Glu
 290

aagttggtgc ttcttatct ccacttatct tttaaggcgc atcagtttg aaatgatgtg 1030
 tggcggtggt ctgcaagtag tcataaatat aatcggcctg agcacttcag atggattgtt 1090
 agaacatgag taaaagcggt tattacggtg tttatTTTGT accaaatcac cgcacgggtg 1150
 aattgaaata ttccagattt gatcaatttc atctgaaaaaa aa 1192

<210> 2
<211> 290
<212> PRT
<213> *Physcomitrella patens*

<400> 2
Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu Leu Asp Gly Lys Val Ser
 1 5 10 15

Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Asp
 20 25 30

Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val Asp Ser Pro Thr Pro Ile
 35 40 45

Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile Val Ile Gly Gly Leu Leu
 50 55 60

Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg Ala Ser Glu Pro Phe Leu
 65 70 75 80

Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu Phe Cys Phe Ala Leu Ser
 85 90 95

Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln Ala Ile Thr Trp Arg Tyr
 100 105 110

Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys His Lys Glu Met Ala Ile
 115 120 125

Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr Val Glu Phe Met Asp Thr

130	135	140
Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg Gln Ile Ser Phe Leu His		
145	150	155
160		
Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile Trp Trp Ala Ile Ala His		
165	170	175
His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser Ala Ala Leu Asn Ser Gly		
180	185	190
Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe Leu Ala Ala Cys Leu Arg		
195	200	205
Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu Phe Trp Gly Arg Tyr Leu		
210	215	220
Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu Asn Leu Val Gln Ala Tyr		
225	230	235
240		
Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys Ile		
245	250	255
Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe Tyr		
260	265	270
Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys		
275	280	285
Thr Glu		
290		
<210> 3		
<211> 687		
<212> DNA		
<213> Thraustochytrium		
<220>		
<221> CDS		
<222> (1)..(588)		
<400> 3		
cgc agc gtg cat aac ctc ggg ctc tgc ctc ttc tcg ggc gcc gtg tgg 48		
Arg Ser Val His Asn Leu Gly Leu Cys Leu Phe Ser Gly Ala Val Trp		
1	5	10
15		
atc tac acg agc tac ctc atg atc cag gat ggg cac ttt cgc agc ctc 96		

Ile Tyr Thr Ser Tyr Leu Met Ile Gln Asp Gly His Phe Arg Ser Leu			
20	25	30	
gag gcg gca acg tgc gag ccg ctc aag cat ccg cac ttc cag ctc atc 144			
Glu Ala Ala Thr Cys Glu Pro Leu Lys His Pro His Phe Gln Leu Ile			
35	40	45	
agc ttg ctc ttt gcg ctg tcc aag atc tgg gag tgg ttc gac acg gtg 192			
Ser Leu Leu Phe Ala Leu Ser Lys Ile Trp Glu Trp Phe Asp Thr Val			
50	55	60	
ctc ctc atc gtc aag ggc aac aag ctc cgc ttc ctg cac gtc ttg cac 240			
Leu Leu Ile Val Lys Gly Asn Lys Leu Arg Phe Leu His Val Leu His			
65	70	75	80
cac gcc acg acc ttt tgg ctc tac gcc atc gac cac atc ttt ctc tcg 288			
His Ala Thr Thr Phe Trp Leu Tyr Ala Ile Asp His Ile Phe Leu Ser			
85	90	95	
tcc atc aag tac ggc gtc gcg gtc aat gct ttc atc cac acc gtc atg 336			
Ser Ile Lys Tyr Gly Val Ala Val Asn Ala Phe Ile His Thr Val Met			
100	105	110	
tac gcg cac tac ttc cgc cca ttc ccg aag ggc ttg cgc ccg ctt att 384			
Tyr Ala His Tyr Phe Arg Pro Phe Pro Lys Gly Leu Arg Pro Leu Ile			
115	120	125	
acg cag ttg cag atc gtc cag ttc atc ttc agc atc ggc atc cat acc 432			
Thr Gln Leu Gln Ile Val Gln Phe Ile Phe Ser Ile Gly Ile His Thr			
130	135	140	
gcc atc tac tgg cac tac gac tgc gag ccg ctc gtg cat acc cac ttt 480			
Ala Ile Tyr Trp His Tyr Asp Cys Glu Pro Leu Val His Thr His Phe			
145	150	155	160
tgg gaa tac gtc acg ccc tac ctc ttc gtc gtg ccc ttc ctc atc ctc 528			
Trp Glu Tyr Val Thr Pro Tyr Leu Phe Val Val Pro Phe Leu Ile Leu			
165	170	175	
ttt ctc aat ttc tac ctg cag cag tac gtc ctc gcg ccc gca aaa acc 576			
Phe Leu Asn Phe Tyr Leu Gln Gln Tyr Val Leu Ala Pro Ala Lys Thr			
180	185	190	
aag aag gca tag ccacgttaaca gtagaccaggc agcgccgagg acgcgtgccc 628			
Lys Lys Ala			
195			
cgttatcgcg aagcacgaaa taaagaagat catttgattc aaaaaaaaaaaaaaaa 687			

<210> 4
<211> 195
<212> PRT
<213> Thraustochytrium

<400> 4

Arg Ser Val His Asn Leu Gly Leu Cys Leu Phe Ser Gly Ala Val Trp
1 5 10 15

Ile Tyr Thr Ser Tyr Leu Met Ile Gln Asp Gly His Phe Arg Ser Leu
20 25 30

Glu Ala Ala Thr Cys Glu Pro Leu Lys His Pro His Phe Gln Leu Ile
35 40 45

Ser Leu Leu Phe Ala Leu Ser Lys Ile Trp Glu Trp Phe Asp Thr Val
50 55 60

Leu Leu Ile Val Lys Gly Asn Lys Leu Arg Phe Leu His Val Leu His
65 70 75 80

His Ala Thr Thr Phe Trp Leu Tyr Ala Ile Asp His Ile Phe Leu Ser
85 90 95

Ser Ile Lys Tyr Gly Val Ala Val Asn Ala Phe Ile His Thr Val Met
100 105 110

Tyr Ala His Tyr Phe Arg Pro Phe Pro Lys Gly Leu Arg Pro Leu Ile
115 120 125

Thr Gln Leu Gln Ile Val Gln Phe Ile Phe Ser Ile Gly Ile His Thr
130 135 140

Ala Ile Tyr Trp His Tyr Asp Cys Glu Pro Leu Val His Thr His Phe
145 150 155 160

Trp Glu Tyr Val Thr Pro Tyr Leu Phe Val Val Pro Phe Leu Ile Leu
165 170 175

Phe Leu Asn Phe Tyr Leu Gln Gln Tyr Val Leu Ala Pro Ala Lys Thr
180 185 190

Lys Lys Ala
195

<210> 5

<211> 955

<212> DNA

<213> Thaustochytrium

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(894)

<400> 5

gtc att tcg ggc ctc gac ctt ctc ccc gtg ctc tcg tgg gag act atg 48
 Val Ile Ser Gly Leu Asp Leu Leu Pro Val Leu Ser Trp Glu Thr Met

1	5	10	15
---	---	----	----

aag ttc gac act gcc gaa gtt gtc tcg gtc tgg ctg cgc acg cac atg 96
 Lys Phe Asp Thr Ala Glu Val Val Ser Val Trp Leu Arg Thr His Met

20	25	30
----	----	----

tgg gtc ccc ttc ctg atg tgc ttc atc tac ctg gtc gtc atc ttc ggc 144
 Trp Val Pro Phe Leu Met Cys Phe Ile Tyr Leu Val Val Ile Phe Gly

35	40	45
----	----	----

atc cag tac tac atg gag gac cgc aag gag ttc gat ctg cgc aag ccg 192
 Ile Gln Tyr Tyr Met Glu Asp Arg Lys Glu Phe Asp Leu Arg Lys Pro

50	55	60
----	----	----

ctg gcc gcc tgg agc gcc ttc ttg gcc att ttc agc atc ggc gcc tcc 240
 Leu Ala Ala Trp Ser Ala Phe Leu Ala Ile Phe Ser Ile Gly Ala Ser

65	70	75	80
----	----	----	----

atc cgc acc gtg ccc gtc ctg ctc aag atg ctc tac gaa aag ggc acg 288
 Ile Arg Thr Val Pro Val Leu Leu Lys Met Leu Tyr Glu Lys Gly Thr

85	90	95
----	----	----

cac cac gtg ctc tgc ggc gac acg cgc aac gac tgg gtc att gac aac 336
 His His Val Leu Cys Gly Asp Thr Arg Asn Asp Trp Val Ile Asp Asn

100	105	110
-----	-----	-----

ccg gcc ggc gtc tgg acc atg gcc ttt atc ttt tcc aag att ccc gag 384
 Pro Ala Gly Val Trp Thr Met Ala Phe Ile Phe Ser Lys Ile Pro Glu

115	120	125
-----	-----	-----

ctc atc gac acc ctc ttt atc gtg ctc cgc aag cgc aag ctc atc acc 432
 Leu Ile Asp Thr Leu Phe Ile Val Leu Arg Lys Arg Lys Leu Ile Thr

130	135	140
-----	-----	-----

ctc cac tgg tac cac cac gtg acc gtg ctc ctg ttc tgc tgg cac gcc 480
 Leu His Trp Tyr His His Val Thr Val Leu Phe Cys Trp His Ala

145	150	155	160
tgg gcc acc ttt gcg ctc acc ggc atc gtc ttt gcc gcc atc aac gcc Trp Ala Thr Phe Ala Leu Thr Gly Ile Val Phe Ala Ala Ile Asn Ala			528
	165	170	175
tcg gtg cac gcc atc atg tac gcc tat tac gcc ttc acg gcc ctc ggc Ser Val His Ala Ile Met Tyr Ala Tyr Tyr Ala Phe Thr Ala Leu Gly			576
	180	185	190
tac cga cca acc tcg tac gcc atc tac att acg ctc att cag atc atg Tyr Arg Pro Thr Ser Tyr Ala Ile Tyr Ile Thr Leu Ile Gln Ile Met			624
	195	200	205
cag atg gtc gtc ggc acc gcc gtc acc ttt tac att ggc tac gac atg Gln Met Val Val Gly Thr Ala Val Thr Phe Tyr Ile Gly Tyr Asp Met			672
	210	215	220
gcc ttt gtc acg ccg cag ccc ttc cgc ctt gac atg aaa ctc aac tgg Ala Phe Val Thr Pro Gln Pro Phe Arg Leu Asp Met Lys Leu Asn Trp			720
	225	230	235
240			
gac ccg ctc agc aag ggc gag aac acc gag ccc acc tgc aag ggc gcc Asp Pro Leu Ser Lys Gly Glu Asn Thr Glu Pro Thr Cys Lys Gly Ala			768
	245	250	255
aac tcc tcc aac gcc atc ttc ggc gtc atc atg tac gcc tcg tac ctc Asn Ser Ser Asn Ala Ile Phe Gly Val Ile Met Tyr Ala Ser Tyr Leu			816
	260	265	270
tac ctc ttc tgc ctc ttc tac atg gcc tac ctg cgc ccg aag aag Tyr Leu Phe Cys Leu Phe Phe Tyr Met Ala Tyr Leu Arg Pro Lys Lys			864
	275	280	285
tcg acg ccc gcg gcc aag aag aca aac taa tcgcacacta ccaaacaatc Ser Thr Pro Ala Ala Lys Lys Thr Asn			914
	290	295	
ttccactcga cctagaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaactcga g			955
<210> 6			
<211> 297			
<212> PRT			
<213> Thaustochytrium			
<400> 6			
Val Ile Ser Gly Leu Asp Leu Leu Pro Val Leu Ser Trp Glu Thr Met			

1	5	10	15
---	---	----	----

Lys Phe Asp Thr Ala Glu Val Val Ser Val Trp Leu Arg Thr His Met			
20	25	30	

Trp Val Pro Phe Leu Met Cys Phe Ile Tyr Leu Val Val Ile Phe Gly			
35	40	45	

Ile Gln Tyr Tyr Met Glu Asp Arg Lys Glu Phe Asp Leu Arg Lys Pro			
50	55	60	

Leu Ala Ala Trp Ser Ala Phe Leu Ala Ile Phe Ser Ile Gly Ala Ser			
65	70	75	80

Ile Arg Thr Val Pro Val Leu Leu Lys Met Leu Tyr Glu Lys Gly Thr			
85	90	95	

His His Val Leu Cys Gly Asp Thr Arg Asn Asp Trp Val Ile Asp Asn			
100	105	110	

Pro Ala Gly Val Trp Thr Met Ala Phe Ile Phe Ser Lys Ile Pro Glu			
115	120	125	

Leu Ile Asp Thr Leu Phe Ile Val Leu Arg Lys Arg Lys Leu Ile Thr			
130	135	140	

Leu His Trp Tyr His His Val Thr Val Leu Leu Phe Cys Trp His Ala			
145	150	155	160

Trp Ala Thr Phe Ala Leu Thr Gly Ile Val Phe Ala Ala Ile Asn Ala			
165	170	175	

Ser Val His Ala Ile Met Tyr Ala Tyr Tyr Ala Phe Thr Ala Leu Gly			
180	185	190	

Tyr Arg Pro Thr Ser Tyr Ala Ile Tyr Ile Thr Leu Ile Gln Ile Met			
195	200	205	

Gln Met Val Val Gly Thr Ala Val Thr Phe Tyr Ile Gly Tyr Asp Met			
210	215	220	

Ala Phe Val Thr Pro Gln Pro Phe Arg Leu Asp Met Lys Leu Asn Trp			
225	230	235	240

Asp Pro Leu Ser Lys Gly Glu Asn Thr Glu Pro Thr Cys Lys Gly Ala			
245	250	255	

Asn Ser Ser Asn Ala Ile Phe Gly Val Ile Met Tyr Ala Ser Tyr Leu			
---	--	--	--

260

265

270

Tyr Leu Phe Cys Leu Phe Phe Tyr Met Ala Tyr Leu Arg Pro Lys Lys
 275 280 285

Ser Thr Pro Ala Ala Lys Lys Thr Asn
 290 295

<210> 7
 <211> 708
 <212> DNA
 <213> Cryptothecodium

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(645)

<400> 7
 cg^g ca^c ga^g gta ca^c at^g ac^c ga^g aag ag^g gg^a ct^g ca^g tt^c ac^g at^c 48
 Arg His Glu Val His Met Thr Glu Lys Arg Gly Leu Gln Phe Thr Ile
 1 5 10 15

tg^c gg^c tc^t ac^t gg^t ga^g tt^g gt^g ca^g aa^t ct^c ca^g ga^t gg^t cc^c ac^t 96
 Cys Gly Ser Thr Gly Glu Leu Val Gln Asn Leu Gln Asp Gly Pro Thr
 20 25 30

gg^c tt^g gc^g tt^g tg^c ct^c tt^t tg^c tt^c ag^c aa^a att cc^c ga^g tt^g at^g 144
 Ala Leu Ala Leu Cys Leu Phe Cys Phe Ser Lys Ile Pro Glu Leu Met
 35 40 45

ga^c ac^g gt^c tt^t ct^c at^c tt^g aag gg^c aag aag gt^t cg^c tt^t tt^g ca^g 192
 Asp Thr Val Phe Leu Ile Leu Lys Gly Lys Lys Val Arg Phe Leu Gln
 50 55 60

tg^g ta^c ca^c ca^c gct ac^c gt^g at^g ct^c tt^c tg^c tt^g gca ct^g gct 240
 Trp Tyr His His Ala Thr Val Met Leu Phe Cys Trp Leu Ala Leu Ala
 65 70 75 80

ac^g ga^g ta^c ac^c cc^g gg^c ct^c tg^g tt^c gc^g gc^c ac^t aa^c ta^c tt^c gt^g 288
 Thr Glu Tyr Thr Pro Gly Leu Trp Phe Ala Ala Thr Asn Tyr Phe Val
 85 90 95

ca^c tc^c at^c at^g ta^c at^g ta^c tt^c tt^c tt^g at^g ac^c tt^c aag ac^g gg^c 336
 His Ser Ile Met Tyr Met Tyr Phe Phe Leu Met Thr Phe Lys Thr Ala
 100 105 110

gc^a aag gt^c gt^g aag cc^c att gg^c cc^t ct^c at^c ac^c at^c at^c cag at^c 384

Ala Lys Val Val Lys Pro Ile Ala Pro Leu Ile Thr Ile Ile Gln Ile
 115 120 125

gcc cag atg gtc tgg ggt ctc atc gtc aac ggc atc gcg atc acc act 432
 Ala Gln Met Val Trp Gly Leu Ile Val Asn Gly Ile Ala Ile Thr Thr
 130 135 140

ttc ttc acc acg ggc gcc tgc cag atc cag tcc gtg acg gtc tac tcg 480
 Phe Phe Thr Thr Gly Ala Cys Gln Ile Gln Ser Val Thr Val Tyr Ser
 145 150 155 160

gcc att gtg atg tac gct tcg tac ttc tac ctc ttc tcc cag ctc ttc 528
 Ala Ile Val Met Tyr Ala Ser Tyr Phe Tyr Leu Phe Ser Gln Leu Phe
 165 170 175

ctg gag gca tac gga tcc gct ggc aag aac aag aag aag ctc gcc cgc 576
 Leu Glu Ala Tyr Gly Ser Ala Gly Lys Asn Lys Lys Lys Leu Ala Arg
 180 185 190

gag ctc tcc cga aag atc tcc gag gct ctc ctg aat agt ggc gac gag 624
 Glu Leu Ser Arg Lys Ile Ser Glu Ala Leu Leu Asn Ser Gly Asp Glu
 195 200 205

gta gcc aag cac ctc aag tga actgagcgac ctcatcttgg tctggtccgc 675
 Val Ala Lys His Leu Lys
 210 215

caaattgccg cgtgcattgtc catgagatgc tgt 708

<210> 8
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Cryptechecodium

<400> 8
 Arg His Glu Val His Met Thr Glu Lys Arg Gly Leu Gln Phe Thr Ile
 1 5 10 15

Cys Gly Ser Thr Gly Glu Leu Val Gln Asn Leu Gln Asp Gly Pro Thr
 20 25 30

Ala Leu Ala Leu Cys Leu Phe Cys Phe Ser Lys Ile Pro Glu Leu Met
 35 40 45

Asp Thr Val Phe Leu Ile Leu Lys Gly Lys Lys Val Arg Phe Leu Gln
 50 55 60

Trp Tyr His His Ala Thr Val Met Leu Phe Cys Trp Leu Ala Leu Ala
65 70 75 80

Thr Glu Tyr Thr Pro Gly Leu Trp Phe Ala Ala Thr Asn Tyr Phe Val
85 90 95

His Ser Ile Met Tyr Met Tyr Phe Phe Leu Met Thr Phe Lys Thr Ala
100 105 110

Ala Lys Val Val Lys Pro Ile Ala Pro Leu Ile Thr Ile Ile Gln Ile
115 120 125

Ala Gln Met Val Trp Gly Leu Ile Val Asn Gly Ile Ala Ile Thr Thr
130 135 140

Phe Phe Thr Thr Gly Ala Cys Gln Ile Gln Ser Val Thr Val Tyr Ser
 145 150 155 160

Ala Ile Val Met Tyr Ala Ser Tyr Phe Tyr Leu Phe Ser Gln Leu Phe
165 170 175

Leu Glu Ala Tyr Gly Ser Ala Gly Lys Asn Lys Lys Lys Leu Ala Arg
180 185 190

Glu Leu Ser Arg Lys Ile Ser Glu Ala Leu Leu Asn Ser Gly Asp Glu
 195 200 205

Val Ala Lys His Leu Lys
210

<210> 9
<211> 1054
<212> DNA
<213> *Thraustochytrium*

<220>
<221> CDS
<222> (43)..(858)

<400> 9
gaattcggca cgagagcgcg cggagcggag acctcggccg cg atg atg gag ccg 54
Met Met Glu Pro
1

ctc gac agg tac agg gcg ctg gcg gag ctc gcc gcg agg tac gcc agc	102		
Leu Asp Arg Tyr Arg Ala Leu Ala Glu Leu Ala Ala Arg Tyr Ala Ser			
5	10	15	20

tcg gcg gcc ttc aag tgg caa gtc acg tac gac gcc aag gac agc ttc		150
Ser Ala Ala Phe Lys Trp Gln Val Thr Tyr Asp Ala Lys Asp Ser Phe		
25	30	35
gtc ggg ccc ctg gga atc cg ^g gag ccg ctc ggg ctc ctg gtg ggc tcc		198
Val Gly Pro Leu Gly Ile Arg Glu Pro Leu Gly Leu Leu Val Gly Ser		
40	45	50
gtg gtc ctc tac ctg agc ctg ctg gcc gtg gtc tac gcg ctg cgg aac		246
Val Val Leu Tyr Leu Ser Leu Leu Ala Val Val Tyr Ala Leu Arg Asn		
55	60	65
tac ctt ggc ggc ctc atg gcg ctc cgc agc gtg cat aac ctc ggg ctc		294
Tyr Leu Gly Gly Leu Met Ala Leu Arg Ser Val His Asn Leu Gly Leu		
70	75	80
tgc ctc ttc tcg ggc gcc gtg tgg atc tac acg agc tac ctc atg atc		342
Cys Leu Phe Ser Gly Ala Val Trp Ile Tyr Thr Ser Tyr Leu Met Ile		
85	90	95
100		
cag gat ggg cac ttt cgc agc ctc gag gcg gca acg tgc gag ccg ctc		390
Gln Asp Gly His Phe Arg Ser Leu Glu Ala Ala Thr Cys Glu Pro Leu		
105	110	115
aag cat ccg cac ttc cag ctc atc agc ttg ctc ttt gcg ctg tcc aag		438
Lys His Pro His Phe Gln Leu Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Ser Lys		
120	125	130
atc tgg gag tgg ttc gac acg gtg ctc ctc atc gtc aag ggc aac aag		486
Ile Trp Glu Trp Phe Asp Thr Val Leu Leu Ile Val Lys Gly Asn Lys		
135	140	145
ctc cgc ttc ctg cac gtc ttg cac cac gcc acg acc ttt tgg ctc tac		534
Leu Arg Phe Leu His Val Leu His His Ala Thr Thr Phe Trp Leu Tyr		
150	155	160
gcc atc gac cac atc ttt ctc tcg tcc atc aag tac ggc gtc gcg gtc		582
Ala Ile Asp His Ile Phe Leu Ser Ser Ile Lys Tyr Gly Val Ala Val		
165	170	175
180		
aat gct ttc atc cac acc gtc atg tac gcg cac tac ttc cgc cca ttc		630
Asn Ala Phe Ile His Thr Val Met Tyr Ala His Tyr Phe Arg Pro Phe		
185	190	195
ccg aag ggc ttg cgc ccg ctt att acg ca ^g ttg cag atc gtc cag ttc		678
Pro Lys Gly Leu Arg Pro Leu Ile Thr Gln Leu Gln Ile Val Gln Phe		
200	205	210

att ttc agc atc ggc atc cat acc gcc att tac tgg cac tac gac tgc 726
 Ile Phe Ser Ile Gly Ile His Thr Ala Ile Tyr Trp His Tyr Asp Cys
 215 220 225

gag ccg ctc gtg cat acc cac ttt tgg gaa tac gtc acg ccc tac ctt 774
 Glu Pro Leu Val His Thr His Phe Trp Glu Tyr Val Thr Pro Tyr Leu
 230 235 240

ttc gtc gtg ccc ttc ctc atc ctc ttt ttc aat ttt tac ctg cag cag 822
 Phe Val Val Pro Phe Leu Ile Leu Phe Phe Asn Phe Tyr Leu Gln Gln
 245 250 255 260

tac gtc ctc gcg ccc gca aaa acc aag aag gca tag ccacgtaaca 868
 Tyr Val Leu Ala Pro Ala Lys Thr Lys Lys Ala
 265 270

gttagaccaggc agcgccgagg acgcgtgccg cgttatcgcg aagcacgaaa taaagaagat 928

catttggattc aacgaggcta cttgcggcca cgagaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 988

aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1048

ctcgag 1054

<210> 10

<211> 271

<212> PRT

<213> Thraustochytrium

<400> 10

Met Met Glu Pro Leu Asp Arg Tyr Arg Ala Leu Ala Glu Leu Ala Ala
 1 5 10 15

Arg Tyr Ala Ser Ser Ala Ala Phe Lys Trp Gln Val Thr Tyr Asp Ala
 20 25 30

Lys Asp Ser Phe Val Gly Pro Leu Gly Ile Arg Glu Pro Leu Gly Leu
 35 40 45

Leu Val Gly Ser Val Val Leu Tyr Leu Ser Leu Leu Ala Val Val Tyr
 50 55 60

Ala Leu Arg Asn Tyr Leu Gly Gly Leu Met Ala Leu Arg Ser Val His
 65 70 75 80

Asn Leu Gly Leu Cys Leu Phe Ser Gly Ala Val Trp Ile Tyr Thr Ser

85

90

95

Tyr Leu Met Ile Gln Asp Gly His Phe Arg Ser Leu Glu Ala Ala Thr
 100 105 110

Cys Glu Pro Leu Lys His Pro His Phe Gln Leu Ile Ser Leu Leu Phe
 115 120 125

Ala Leu Ser Lys Ile Trp Glu Trp Phe Asp Thr Val Leu Leu Ile Val
 130 135 140

Lys Gly Asn Lys Leu Arg Phe Leu His Val Leu His His Ala Thr Thr
 145 150 155 160

Phe Trp Leu Tyr Ala Ile Asp His Ile Phe Leu Ser Ser Ile Lys Tyr
 165 170 175

Gly Val Ala Val Asn Ala Phe Ile His Thr Val Met Tyr Ala His Tyr
 180 185 190

Phe Arg Pro Phe Pro Lys Gly Leu Arg Pro Leu Ile Thr Gln Leu Gln
 195 200 205

Ile Val Gln Phe Ile Phe Ser Ile Gly Ile His Thr Ala Ile Tyr Trp
 210 215 220

His Tyr Asp Cys Glu Pro Leu Val His Thr His Phe Trp Glu Tyr Val
 225 230 235 240

Thr Pro Tyr Leu Phe Val Val Pro Phe Leu Ile Leu Phe Phe Asn Phe
 245 250 255

Tyr Leu Gln Gln Tyr Val Leu Ala Pro Ala Lys Thr Lys Lys Ala
 260 265 270

<210> 11

<211> 421

<212> DNA

<213> Phytophthora infestans

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(279)

<400> 11

cac acc atc atg tac act tac tac ttc gtc agc gcc cac acg cgc aac 48
 His Thr Ile Met Tyr Thr Tyr Tyr Phe Val Ser Ala His Thr Arg Asn

1	5	10	15
att tgg tgg aag aag tac ctc acg cgc att cag ctt atc cag ttc gtg			96
Ile Trp Trp Lys Lys Tyr Leu Thr Arg Ile Gln Leu Ile Gln Phe Val			
20	25	30	
acc atg aac gtg cag ggc tac ctg acc tac tct cga cag tgc cca ggc			144
Thr Met Asn Val Gln Gly Tyr Leu Thr Tyr Ser Arg Gln Cys Pro Gly			
35	40	45	
atg cct cct aag gtg ccg ctc atg tac ctt gtg tac gtg cag tca ctc			192
Met Pro Pro Lys Val Pro Leu Met Tyr Leu Val Tyr Val Gln Ser Leu			
50	55	60	
ttc tgg ctc ttc atg aat ttc tac att cgc gcg tac gtg ttc ggc ccc			240
Phe Trp Leu Phe Met Asn Phe Tyr Ile Arg Ala Tyr Val Phe Gly Pro			
65	70	75	80
aag aaa ccg gcc gtg gag gaa tcg aag aag ttg taa cggcgcttgt			289
Lys Lys Pro Ala Val Glu Glu Ser Lys Lys Lys Leu			
85	90		
taaaaaagtct aaccctcgctg taacagctta aaacacacac acacacaacg cttttagag			349
gaggtaagta gtggcaactc gtgtagaaat gcagcatgcc catcaaatac atcccgatag			409
attcatacta ct			421
<210> 12			
<211> 92			
<212> PRT			
<213> Phytophthora infestans			
<400> 12			
His Thr Ile Met Tyr Thr Tyr Phe Val Ser Ala His Thr Arg Asn			
1	5	10	15
Ile Trp Trp Lys Lys Tyr Leu Thr Arg Ile Gln Leu Ile Gln Phe Val			
20	25	30	
Thr Met Asn Val Gln Gly Tyr Leu Thr Tyr Ser Arg Gln Cys Pro Gly			
35	40	45	
Met Pro Pro Lys Val Pro Leu Met Tyr Leu Val Tyr Val Gln Ser Leu			
50	55	60	
Phe Trp Leu Phe Met Asn Phe Tyr Ile Arg Ala Tyr Val Phe Gly Pro			

65

70

75

80

Lys Lys Pro Ala Val Glu Glu Ser Lys Lys Lys Leu
85 90

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
16. August 2001 (16.08.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/59128 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/54, 15/82, 9/10, A01H 5/00, C07K 16/40, C12P 7/64, C11B 1/00, C11C 1/00, G01N 33/573, C12Q 1/48, A61K 38/45
- (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HEINZ, Ernst [DE/DE]; Püttkampsweg 13, 22609 Hamburg (DE). ZANK, Thorsten [DE/DE]; Lorenzengasse 13, 22303 Hamburg (DE). ZÄHRINGER, Ulrich [DE/DE]; Parkallee 22, 23845 Borstel (DE). LERCHL, Jens [DE/DE]; Im Steg 36, 68526 Ladenburg (DE). RENZ, Andreas [DE/DE]; Heinrich-von-Kleist-Str. 6, 67117 Limburgerhof (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/01346
- (22) Internationales Anmeldedatum:
8. Februar 2001 (08.02.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
100 05 973.2 9. Februar 2000 (09.02.2000) DE
100 23 893.9 17. Mai 2000 (17.05.2000) DE
100 63 387.0 19. Dezember 2000 (19.12.2000) DE
- (74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; 67056 Ludwigshafen (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: NOVEL ELONGASE GENE AND METHOD FOR PRODUCING MULTIPLE-UNSATURATED FATTY ACIDS

(54) Bezeichnung: NEUES ELONGASEGEN UND VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG MEHRFACH UNGESÄTTIGTER FETTSÄUREN

(57) Abstract: The invention relates to a novel elongase gene comprising the sequences cited in sequence SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 and SEQ ID NO:7 or to homologues, derivatives or analogues thereof. The invention also relates to a gene construct containing these genes or homologues, derivatives or analogues thereof, and to its use. The invention additionally relates to the vectors or transgenic organisms containing an elongase gene comprising the sequence SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 and SEQ ID NO:7 or containing homologues, derivatives or analogues thereof. The invention relates to the use of the elongase sequences alone or in combination with additional elongases and/or with additional fatty acid biosynthesis genes. The invention relates to a novel elongase gene comprising the sequence SEQ ID NO:1 or to homologues, derivatives or analogues thereof. The invention also relates to a method for producing multiple-unsaturated fatty acids and to a method for introducing DNA into organisms which produce large quantities of oils and, in particular, oils having a high content of unsaturated fatty acids. The invention further relates to an oil and/or to a fatty acid preparation having a high content of multiple-unsaturated fatty acids that contain at least two double bonds and/or to a triacylglycerin preparation having a high content of multiple-unsaturated fatty acids that contain at least two double bonds.

A3
WO 01/59128

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein neues Elongasegen mit den in Sequenz SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 und SEQ ID NO:7 genannten Sequenzen oder ihre Homologen, Derivate oder Analoga, ein Genkonstrukt, das diese Gene oder ihre Homologen, Derivate oder Analoga enthält, sowie seine Verwendung. Die Erfindung betrifft zudem Vektoren oder transgene Organismen, die ein Elongasegen mit der Sequenz SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 und SEQ ID NO:7 oder seine Homologen, Derivate oder Analoga enthalten. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung der Elongasesequenzen allein oder in Kombination mit weiteren Elongasen und/oder weiteren Fettsäure-Biosynthesegegenen. Diese Erfindung betrifft ein neues Elongasegen mit der Sequenz SEQ ID NO:1 oder seine Homologen, Derivate oder Analoga. Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren sowie ein Verfahren zum Einbringen von DNA in Organismen, die grosse Mengen an Ölen und insbesondere Ölen mit hohem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren produzieren. Außerdem betrifft die Erfindung ein Öl und/oder eine Fettsäure-Zubereitung mit höherem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen und/oder eine Triacylglycerin-Zubereitung mit höherem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen.



eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht*

**(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts:** 20. Dezember 2001

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte .onal Application No
PCT/EP 01/01346

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7	C12N15/54	C12N15/82	C12N9/10	A01H5/00	C07K16/40
	C12P7/64	C11B1/00	C11C1/00	G01N33/573	C12Q1/48
	A61K38/45				

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K C12P A01H C11B C11C G01N C12Q A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>MILLAR A AND KUNST L: "Very-long-chain fatty acid biosynthesis is controlled through the expression and specificity of the condensing enzyme" PLANT JOURNAL, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, GB, vol. 12, no. 1, 1997, pages 121-131, XP002125076 ISSN: 0960-7412 the whole document</p> <p>----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1,3,5,6, 9-24,26, 27



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 August 2001

Date of mailing of the international search report

28/08/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Oderwald, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte onal Application No

PCT/EP 01/01346

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EM_EST 'Online! EMBL Heidelberg; AC/ID AW156099, 9 November 1999 (1999-11-09) QUATRANO R ET AL.: "ga22h08.y1 Moss EST library PPU Physcomitrella patens cDNA clone" XP002174837 abstract ---	1-6, 10-12, 15, 26, 27
X	WO 98 46764 A (THURMOND JENNIFER ;CALGENE LLC (US); ABBOTT LAB (US); KNUTZON DEBO) 22 October 1998 (1998-10-22) cited in the application the whole document ---	7, 8, 22-25
P, X	ZANK T K ET AL: "Cloning and functional expression of the first plant fatty acid elongase specific for DELTA6-polyunsaturated fatty acids." BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, vol. 28, no. 6, December 2000 (2000-12), pages 654-658, XP002174836 ISSN: 0300-5127 the whole document ---	1-6, 9-12, 14-19, 21-24, 26, 27
P, X	WO 00 12720 A (ABBOTT LAB) 9 March 2000 (2000-03-09) the whole document -----	1-28

Additional matter PCT/ISA/210

The International Searching Authority has found that this international application contains multiple inventions, as follows:

1. Claims Nos. 1-28 (in part)

Isolated nucleic acid with SEQ ID NO: 1, which codes for a PUFA (polyunsaturated fatty acid)-specific elongase from *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO: 2); Amino acid sequence coded by said nucleic acid; gene construct, vector, organism, antibody, antisense nucleic acid molecule, method for preparing PUFA's, oils, lipids or fatty acids, uses, compositions, kit and method for identifying an antagonist or agonist comprising said nucleic acid and amino acid sequence.

2. Claims Nos. 1-28 (in part)

Analogous to Invention No. 1, but comprising a PUFA elongase from *Thraustochytrium* (SEQ ID NO: 3-6).

3. Claims Nos. 1-28 (in part)

Analogous to Invention No. 1, but comprising an elongase from *Cryptocodinium* (SEQ ID NO: 7 and 8).

Continuation of Field I.2**Claims Nos. 26, 27 (in part)**

Relevant Patent Claims Nos. 26 and 27 relate, in part, to products/compounds respectively characterized by a worthwhile peculiarity or quality, namely an antagonist or agonist of elongases. The Patent Claims thus comprise all products, etc., which have this peculiarity or quality, whereas the description of the patent application does not provide any support for such products, etc. under the terms of PCT Article 5. In the case in question, the patent claims lack the corresponding support and the patent application lacks the necessary disclosure to such a degree that a meaningful search appears to be impossible to conduct with respect to the entire scope for which protection is sought. Nevertheless, the patent claims also lack the clarity required in PCT Article 6, whereby an attempt was made to define the products/compounds in terms of the respectively desired outcome. This absence of clarity is such that it makes it impossible to conduct a meaningful search with respect to the entire scope for which protection is sought. For this reason, the search was directed at the portions of the patent claims which can be regarded as clear, supported or disclosed in the above-mentioned sense, namely at the portions conducted.

The applicant is therefore advised that patent claims or sections of patent claims laid to inventions for which no international search report was drafted normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). Similar to the authority entrusted with the task of carrying out the international preliminary examination, the EPO also does not generally carry out a preliminary examination of subject matter for which no search has been conducted. This is also valid in the case when the patent claims have been amended after receipt of the international search report (PCT Article 19), or in the case when the applicant submits new patent claims pursuant to the procedure in accordance with PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/01346

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9846764	A	22-10-1998	US 5972664 A		26-10-1999
			US 6075183 A		13-06-2000
			US 5968809 A		19-10-1999
			US 6051754 A		18-04-2000
			AU 720677 B		08-06-2000
			AU 7114798 A		11-11-1998
			AU 720725 B		08-06-2000
			AU 7114898 A		11-11-1998
			BG 103796 A		31-05-2000
			BG 103798 A		31-05-2000
			BR 9808506 A		23-05-2000
			BR 9809083 A		01-08-2000
			CN 1253587 T		17-05-2000
			CN 1253588 T		17-05-2000
			EP 0996732 A		03-05-2000
			EP 1007691 A		14-06-2000
			HU 0001295 A		28-07-2000
			NO 994924 A		30-11-1999
			NO 994926 A		30-11-1999
			PL 336067 A		05-06-2000
			PL 336077 A		05-06-2000
			SK 139799 A		16-05-2000
			SK 139999 A		16-05-2000
			TR 9902466 T		21-07-2000
			TR 9902474 T		21-02-2000
			WO 9846765 A		22-10-1998
			AU 726807 B		23-11-2000
			AU 6961698 A		11-11-1998
			BG 103797 A		28-04-2000
			BR 9808507 A		23-05-2000
			CN 1252099 T		03-05-2000
			EP 0975766 A		02-02-2000
			HU 0001236 A		28-07-2000
			NO 994925 A		30-11-1999
			PL 336143 A		05-06-2000
			SK 139899 A		16-05-2000
			TR 9902465 T		21-01-2000
			WO 9846763 A		22-10-1998
			US 6136574 A		24-10-2000
			HU 0001517 A		28-08-2000
-----	-----	-----	-----	-----	-----
WO 0012720	A	09-03-2000	AU 5696499 A		21-03-2000
			EP 1108039 A		20-06-2001
-----	-----	-----	-----	-----	-----

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 01/01346

A. KLASSEFIZIERTUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES					
IPK 7	C12N15/54	C12N15/82	C12N9/10	A01H5/00	C07K16/40
	C12P7/64	C11B1/00	C11C1/00	G01N33/573	C12Q1/48
	A61K38/45				

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationsystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K C12P A01H C11B C11C G01N C12Q A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>MILLAR A AND KUNST L: "Very-long-chain fatty acid biosynthesis is controlled through the expression and specificity of the condensing enzyme" PLANT JOURNAL, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, GB, Bd. 12, Nr. 1, 1997, Seiten 121-131, XP002125076 ISSN: 0960-7412 das ganze Dokument</p> <p>----</p> <p>-/-</p>	1,3,5,6, 9-24,26, 27

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzipps oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

16. August 2001

28/08/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Oderwald, H

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/01346

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE EM_EST 'Online! EMBL Heidelberg; AC/ID AW156099, 9. November 1999 (1999-11-09) QUATRANO R ET AL.: "ga22h08.y1 Moss EST library PPU Physcomitrella patens cDNA clone" XP002174837 Zusammenfassung ---	1-6, 10-12, 15, 26, 27
X	WO 98 46764 A (THURMOND JENNIFER ; CALGENE LLC (US); ABBOTT LAB (US); KNUTZON DEBO) 22. Oktober 1998 (1998-10-22) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	7, 8, 22-25
P, X	ZANK T K ET AL: "Cloning and functional expression of the first plant fatty acid elongase specific for DELTA6-polyunsaturated fatty acids." BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, Bd. 28, Nr. 6, Dezember 2000 (2000-12), Seiten 654-658, XP002174836 ISSN: 0300-5127 das ganze Dokument ---	1-6, 9-12, 14-19, 21-24, 26, 27
P, X	WO 00 12720 A (ABBOTT LAB) 9. März 2000 (2000-03-09) das ganze Dokument -----	1-28

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-28 teilweise

Isolierte Nukleinsäure mit SEQ ID NO: 1, die für eine PUFA (polyunsaturated fatty acid)-spezifische Elongase aus *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO: 2) kodiert. Durch genannte Nukleinsäure kodierte Aminosäuresequenz. Genkonstrukt, Vektor, Organismus, Antikörper, Antisense-Nukleinsäuremolekül, Verfahren zur Herstellung von PUFAs, Öle, Lipide oder Fettsäuren, Verwendungen, Zusammensetzungen, Kit und Verfahren zur Identifikation eines Antagonisten oder Agonisten umfassend genannte Nukleinsäure und Aminosäuresequenz.

2. Ansprüche: 1-28 teilweise

entsprechend Erfindung 1, aber eine PUFA Elongase aus *Thraustochytrium* (SEQ ID NO: 3-6) umfassend.

3. Ansprüche: 1-28 teilweise

entsprechend Erfindung 1, aber eine Elongase aus *Cryptocodinium* (SEQ ID NO: 7 und 8) umfassend.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 26, 27 teilweise

Die geltenden Patentansprüche 26 und 27 beziehen sich teilweise auf Produkte/Verbindungen, jeweils charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich Antagonist oder Agonist von Elongasen. Die Patentansprüche umfassen daher alle Produkte etc., die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung keine Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT solcher Produkte etc. liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, die Produkte/Verbindungen über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde keine Recherche für diese Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Teile durchgeführt.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/01346

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9846764	A	22-10-1998	US 5972664 A	26-10-1999
			US 6075183 A	13-06-2000
			US 5968809 A	19-10-1999
			US 6051754 A	18-04-2000
			AU 720677 B	08-06-2000
			AU 7114798 A	11-11-1998
			AU 720725 B	08-06-2000
			AU 7114898 A	11-11-1998
			BG 103796 A	31-05-2000
			BG 103798 A	31-05-2000
			BR 9808506 A	23-05-2000
			BR 9809083 A	01-08-2000
			CN 1253587 T	17-05-2000
			CN 1253588 T	17-05-2000
			EP 0996732 A	03-05-2000
			EP 1007691 A	14-06-2000
			HU 0001295 A	28-07-2000
			NO 994924 A	30-11-1999
			NO 994926 A	30-11-1999
			PL 336067 A	05-06-2000
			PL 336077 A	05-06-2000
			SK 139799 A	16-05-2000
			SK 139999 A	16-05-2000
			TR 9902466 T	21-07-2000
			TR 9902474 T	21-02-2000
			WO 9846765 A	22-10-1998
			AU 726807 B	23-11-2000
			AU 6961698 A	11-11-1998
			BG 103797 A	28-04-2000
			BR 9808507 A	23-05-2000
			CN 1252099 T	03-05-2000
			EP 0975766 A	02-02-2000
			HU 0001236 A	28-07-2000
			NO 994925 A	30-11-1999
			PL 336143 A	05-06-2000
			SK 139899 A	16-05-2000
			TR 9902465 T	21-01-2000
			WO 9846763 A	22-10-1998
			US 6136574 A	24-10-2000
			HU 0001517 A	28-08-2000
-----	-----	-----	-----	-----
WO 0012720	A	09-03-2000	AU 5696499 A	21-03-2000
			EP 1108039 A	20-06-2001
-----	-----	-----	-----	-----